

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Chirurgiche

Ciclo XXX

Settore Concorsuale: 06/N1

Settore Scientifico Disciplinare: MED/46

Evidenziazione sierologica e molecolare di *Chlamydia pneumoniae* e *Simkania negevensis* in pazienti affetti da patologia aterosclerotica carotidea.

Presentata da: Roberta Biondi

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Annalisa Patrizi

Supervisore

Prof. Gianandrea Pasquinelli

Esame finale anno 2018

Indice

Riassunto	Pag. 1
Introduzione	Pag. 2
1. <i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pag. 9
1.1 Definizione e classificazione	
1.2 La cellula batterica	
1.3 Ciclo biologico	
1.4 Genoma	
1.5 Sensibilità ai farmaci	
1.6 Sieroprevalenza	
1.6.1 Età di acquisizione	
1.6.2 Patologie associate	
2. <i>Simkania negevensis</i>	Pag. 18
2.1 Definizione e classificazione	
2.2 La cellula batterica	
2.3 Ciclo biologico	
2.4 Genoma	
2.5 Sensibilità ai farmaci	
2.6 Sieroprevalenza	
2.6.1 Età di acquisizione	
2.6.2 Patologie associate	
3. Diagnosi di laboratorio	Pag. 32
3.1 Isolamento e identificazione in colture cellulari	
3.2 Tecniche di biologia molecolare	

3.3 Metodi immunoenzimatici

3.4 Microimmunofluorescenza

Scopo del lavoro	Pag. 42
Materiali e metodi	Pag. 44
Risultati	Pag. 54
Discussione	Pag. 56
Bibliografia	Pag. 58

Riassunto

C. pneumoniae e *S. negevensis* sono batteri appartenenti all'ordine *Chlamydiales*, principalmente associati a patologie respiratorie. *C. pneumoniae* è stata però ampiamente studiata in altre patologie perlopiù croniche, tra cui l'aterosclerosi.

La capacità di *C. pneumoniae* di infettare macrofagi, monociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce ha contribuito all'ipotesi che questo microrganismo possa influire sullo sviluppo dell'aterosclerosi, mediante cronicizzazione dell'infezione.

Caratteristiche comuni possono essere riscontrate in *S. negevensis*, che possiede la stessa capacità di infettare i macrofagi e usarli come veicolo di disseminazione, inoltre è stata riscontrata la capacità di infettare cellule endoteliali della parete vascolare e instaurare a questo livello infezioni di tipo persistente.

Considerate le opinioni contrastanti sulla correlazione tra *C. pneumoniae* e patologia aterosclerotica, e l'assenza di dati su *S. negevensis* e patologie croniche come l'aterosclerosi, ci è sembrato utile valutare la presenza di anticorpi specifici contro questi microrganismi e la presenza del DNA di entrambi in placche prelevate dopo endoarteriectomia carotidea.

Nei 50 sieri raccolti si è riscontrata una positività per le IgG anti-*S. negevensis* del 28% e del 10% per le IgA, percentuali notevolmente superiori di quelle riscontrabili in controlli sani; per *C. pneumoniae* le percentuali evidenziate, del 20% per le IgG e dell'8% per le IgA, sono risultate paragonabili a quelle riportate da altri studi.

I dati molecolari della PCR sono risultati particolarmente interessanti poiché si è evidenziato un 34% di positività per *S. negevensis* e un 26% per *C. pneumoniae*: queste percentuali risultano più alte rispetto ai dati sierologici ottenuti, avvalorando ulteriormente l'ipotesi che questi microrganismi possano sviluppare uno stato quiescente o persistente di infezione, nel quale però è possibile riscontrare, mediante PCR, il DNA dei stessi all'interno del tessuto patologico.

Introduzione

L'aterosclerosi, base delle patologie dell'arteria coronarica (CAD) e dell'attacco ischemico, è la causa più comune di morte e disabilità nel mondo. L'aterosclerosi è caratterizzata da lesioni dette placche ateromatose e/o fibroadipose, che sporgono all'interno del lume del vaso ostruendolo e rendendo debole la tonaca media. I dati epidemiologici sull'aterosclerosi sono basati sulla frequenza del numero di decessi causati da cardiopatia ischemica.

Le lesioni aterosclerotiche sono classificate in sei categorie, rappresentate schematicamente nella figura 1, nella quale le lesioni di tipo Vb e Vc corrispondono rispettivamente alla categoria VII e VIII, dove le prime hanno una calcificazione predominante e le seconde consistono principalmente di tessuto fibroso (1).

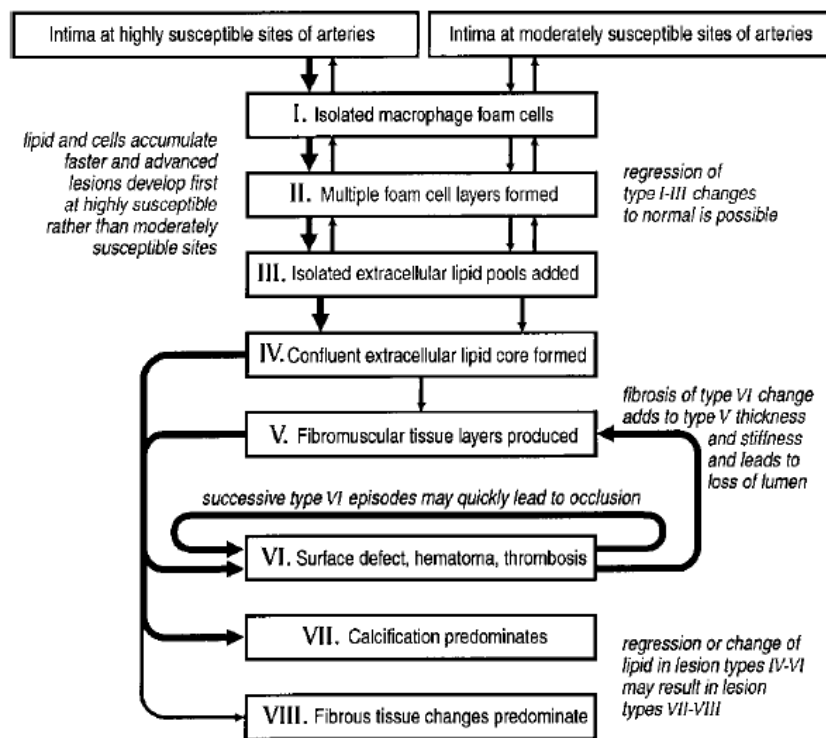


Figura 1. Classificazione Schematica delle lesioni aterosclerotiche (Stary -2000)

Le strie lipidiche sono la lesione più precoce dell'aterosclerosi e sono composte da cellule schiumose ricche di lipidi. Non creano nessun ispessimento significativo quindi non causano alcuna alterazione di flusso, contengono linfociti T e una piccola quantità di lipidi extracellulari. Le strie lipidiche sono state evidenziate in studi nell'aorta di alcuni bambini di età inferiore a 1 anno e in tutti i bambini di età superiore ai 10 anni, indipendentemente da altri fattori (2). Lo sviluppo di strie lipidiche è legato agli stessi fattori di rischio associati

comunemente all'aterosclerosi negli adulti, non tutte le strie lipidiche sono però destinate a evolversi in placche o lesioni più avanzate.

Le placche aterosclerotiche si sviluppano soprattutto nelle arterie elastiche e in arterie muscolari di grande o medio calibro. Proprio per questo le maggiori conseguenze dell'aterosclerosi sono infarto del miocardio, ictus, aneurismi aortici e arteriopatia periferica. Le placche possono frammentarsi e favorire la formazione di trombi che contribuiscono ulteriormente a ostruire il flusso ematico. Esse sono costituite da tre componenti: gli elementi cellulari, tra cui le cellule muscolari lisce, i macrofagi e altri leucociti; la matrice extracellulare, formata da collagene, fibre elastiche e proteoglicani; i depositi intracellulari ed extracellulari di lipidi. Generalmente le placche vanno incontro a un processo di evoluzione, aumentando progressivamente le loro dimensioni, attraverso fenomeni di morte e degenerazione della matrice extracellulare.

I fattori che possono influire sullo sviluppo della patologia sono molteplici, tra questi abbiamo l'età, il sesso, i fattori genetici, e altri non genetici. L'età ha una grossa influenza, poiché la mortalità dovuta a cardiopatia ischemica aumenta proporzionalmente con l'avanzare dell'età, e l'aterosclerosi non risulta evidente fino al raggiungimento di un'età media o avanzata. A parità di altri fattori, il sesso maschile è molto più suscettibile all'aterosclerosi e alle sue conseguenze. La predisposizione familiare all'aterosclerosi e alla cardiopatia ischemica coinvolge probabilmente più geni, legata alla presenza di diversi fattori di rischio, tra cui l'ipertensione e il diabete. I fattori non genetici sono generalmente tutti potenzialmente reversibili, poiché controllabili, tra questi i principali sono l'iperlipidemia, l'ipertensione, il fumo di sigaretta e il diabete (2).

Vista l'importanza che questa patologia ricopre, sono stati svolti numerosi studi e ipotesi per scoprirne le cause. L'attuale modello, chiamato *ipotesi della reazione al danno*, considera l'aterosclerosi come una risposta infiammatoria cronica della parete arteriosa scatenata da un danno a carico dell'endotelio. I fenomeni che avvalorano questa teoria sono:

- danno endoteliale cronico, spesso lieve, con conseguente disfunzione endoteliale e una maggiore permeabilità, adesività leucocitaria e potenziale trombogenico;
- accumulo di lipoproteine nella parete del vaso;
- modificazione delle lipoproteine accumulate tramite processo di ossidazione;
- adesione dei monociti ematici all'endotelio, e successiva migrazione nell'intima e trasformazione in macrofagi e cellule schiumose;

- adesione piastrinica;
- liberazione di fattori che causano la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla tonaca media all'intima;
- proliferazione delle cellule muscolari lisce all'interno dell'intima, sintesi di matrice extracellulare con accumulo di collagene e proteoglicani;
- aumento dell'accumulo di lipidi.

Nel corso degli anni sono stati ipotizzati altri fattori implicati nell'aterogenesi, uno dei più interessanti è l'infezione, sia batteri che virus sono stati presi in considerazione, in particolare *Chlamydia pneumoniae* e il *cytomegalovirus*. Entrambi i microrganismi sono ampiamente diffusi nella popolazione, sono in grado di infettare cellule della parete vascolare e hanno la capacità di persistere nel sito di infezione, anche in forma latente, e causare cronicità e recidive di infezione (2).

Varie infezioni batteriche e virali possono interagire con i classici fattori di rischio cardiovascolari come il fumo di sigaretta, l'ipertensione, l'iperglicemia, dislipidemia, e altri fattori e prodotti pro-infiammatori come omocisteina, angiotensina II, radicali liberi, citochine e chemochine.

Le prime ipotesi che *C. pneumoniae* potrebbe essere associata all'aterosclerosi vennero fatte nel 1988 da Saikku et al. (3), questo diede il via a tutta una serie di studi per cercare di dimostrare questo coinvolgimento nella patologia e ha permesso di approfondire l'argomento in diverse aree (4):

- dati sieroepidemiologici, con riscontri di alti livelli di anticorpi anti-*C. pneumoniae* in pazienti con arteriopatia coronarica rispetto ai controlli sani, con presenza di markers del microrganismo associati a patologia cerebrovascolare, e associazione tra il microrganismo e aneurismi dell'aorta addominale;
- identificazione diretta del microrganismo all'interno delle placche aterosclerotiche, tramite microscopia elettronica, PCR e immunostochimica, non solo nelle arterie coronariche ma anche in altri siti in cui si sviluppa l'aterosclerosi;
- esperimenti su modelli animali, con l'utilizzo di un modello di coniglio che ha mostrato come *C. pneumoniae* potrebbe stimolare la dilatazione dell'aorta attraverso attivazione specifica dei macrofagi e una risposta infiammatoria antigene-mediata;
- dimostrazione dell'abilità di microrganismi infettanti o dei loro componenti strutturali di indurre risposte pro-aterogeniche e protrombotiche in cellule, come

monociti, macrofagi, linfociti T, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, coinvolte nell'aterogenesi;

- studi interventistici con l'uso di antibiotici attivi per le clamidie.

Negli studi effettuati vennero evidenziate delle caratteristiche interessanti, come la capacità di *C. pneumoniae* di essere trasportata nel circolo da monociti o macrofagi infettati dal tratto respiratorio a una superficie endoteliale distante e contribuire alla sua disfunzione. Inoltre, è stato dimostrato che il lipopolisaccaride di *C. pneumoniae* può non solo indurre l'ossidazione di lipidi a bassa densità ma anche la trasformazione di fagociti mononucleati umani in cellule schiumose, un evento aterogenico chiave che occorre nello spazio subendoteliale (5). Un altro possibile meccanismo di danno che *C. pneumoniae* può stimolare è l'aumento nel tessuto dell'attività dei fattori infiammatori e l'adesione delle piastrine, e quindi promuovere la trombogenicità. L'infezione nei monociti o macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce del tessuto vascolare ha mostrato un'induzione della produzione di proteine pro-infiammatorie e pro-coagulanti, attraverso l'attivazione di fattori trascrizionali nucleari, come NF-kB, in queste cellule (4). Negli studi *in vitro*, la propagazione del microrganismo all'interno di monociti e macrofagi favorisce la produzione di citochine pro-infiammatorie, come interleuchina (IL)-1 α , IL-6, tumor-necrosis factor (TNF)- α , proteina chemoattrattiva monocitaria-1, proteina infiammatoria macrofagica 1 α e IL-12, che possono promuovere la progressione della lesione e IL-10 che può prevenire l'apoptosi per perpetuare l'infiammazione. È stato osservato che anche l'heat shock protein della clamidia promuove l'attivazione dei macrofagi, stimolando l'espressione di TNF- α e della metalloproteinasi della matrice, che possono contribuire all'indebolimento e conseguente rottura della placca (Figura 2). Allo stesso modo l'infezione a carico delle cellule muscolari lisce induce la produzione di IL-6, del fattore di crescita basico dei fibroblasti (bFGF) e metalloproteinasi della matrice, che possono contribuire alla destabilizzazione della placca (6).

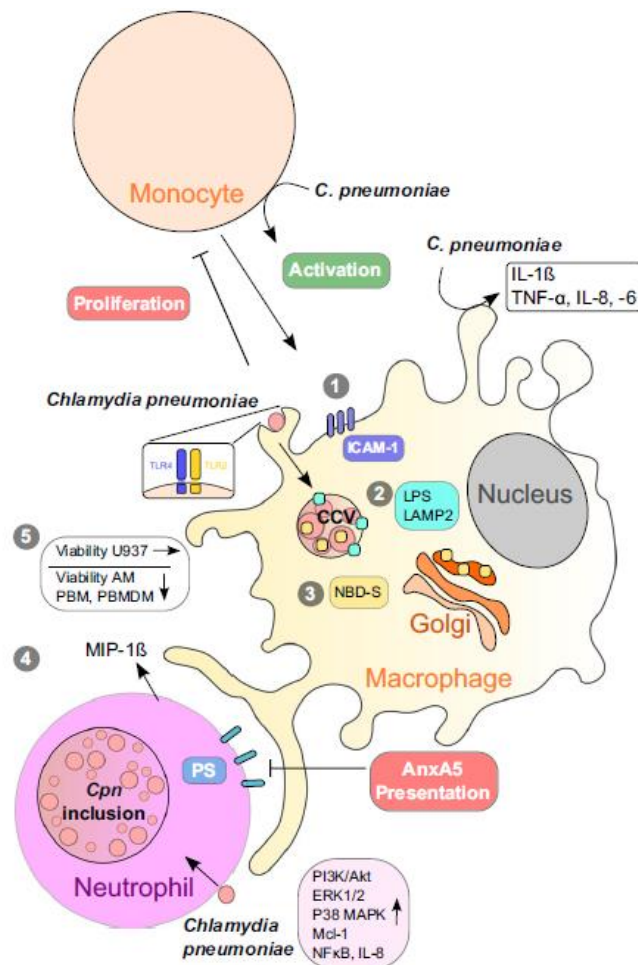


Figura 2. Interazioni tra *C. pneumoniae* e monociti, neutrofilii e macrofagi (Herweg et al.)

In aggiunta, gli studi effettuati *in vivo* hanno testato l'effetto di un trattamento antibiotico su un'aterogenesi sperimentale modificata in topi e conigli infettati con *C. pneumoniae*. Hanno riportato che l'azitromicina previene l'accelerazione dell'aterosclerosi in conigli iperlipidemici infettati con *C. pneumoniae* ma non sembra eradicare il microrganismo (4) (7).

Al momento, il ruolo di *C. pneumoniae* è ancora controverso, sono quindi necessari ulteriori studi per chiarire il ruolo di questo microrganismo nello sviluppo dell'aterosclerosi.

Recenti studi nel campo della microbiologia clinica, hanno evidenziato lo sviluppo di nuovi microrganismi, definiti come "chlamydia-like organisms" perché facenti parte dell'ordine *Chlamydiales*, che hanno destato interesse in quanto di alcuni di essi ampiamente diffusi nella popolazione, non è ancora del tutto noto il ruolo patogeno.

Tra questi patogeni emergenti, *Simkania negevensis* ha destato particolare interesse vista l'elevata incidenza e sieroprevalenza evidenziata da alcuni gruppi di ricerca in varie parti del mondo. In base a questi studi *S. negevensis*, il cui ruolo patogeno è ancora da definire data la sua ampia diffusione nella popolazione, è stata associata a bronchioliti nei bambini e polmoniti e malattia polmonare cronico ostruttiva negli adulti.

È molto diffuso nell'ambiente, data la sua capacità di sopravvivere nelle amebe anche in fase cistica, per cui è stata ipotizzata una sua possibile trasmissione in seguito al contatto con acque in cui sono presenti amebe (8). Finora è noto il suo ruolo in patologie delle basse vie aeree.

Nei pochi studi effettuati è stata evidenziata la capacità di *Simkania negevensis* di introdursi all'interno di macrofagi e disseminarsi quindi nelle varie parti dell'organismo (9). Questa capacità fa sorgere numerose domande sul suo possibile coinvolgimento in patologie ben note come l'aterosclerosi, viste le similitudini biologiche che questo microrganismo presenta con *C. pneumoniae*.

A favore di questa teoria sono stati riportati dei dati interessanti da Friedman et al. (10), dove è stato rilevato il DNA di *S. negevensis* in sezioni provenienti da arterie carotidi. Questo indica come il microrganismo possa essere trovato nel sistema cardiovascolare. È necessario sottolineare che l'infezione da *S. negevensis* può essere di tre tipi: attiva, persistente o criptica.

È stato documentato da Kahane et al (11)., inoltre, che *S. negevensis*, ha la capacità di infettare cellule endoteliali vascolari, nelle quali molto spesso si hanno infezioni persistenti o criptiche, rendendo così l'infezione a livello tissutale cronica.

Nel corso degli anni è stata valutata la presenza di questo microrganismo in diversi tessuti, uno studio ha preso in considerazione l'infezione da *S. negevensis* nei pazienti trapiantati: un'elevata percentuale di trapiantati di polmone con infezione da *S. negevensis* andrebbe incontro a rigetto rispetto ai trapiantati non infetti (12); studi successivi si sono poi spostati ad altri organi, come l'intestino e i reni, visto la capacità di *S. negevensis* di sopravvivere all'interno di amebe e usarle come veicolo di disseminazione all'interno dell'ospite. Per quanto riguarda i reni, è stata valutata la presenza di anticorpi anti-*S. negevensis* in pazienti sottoposti a dialisi o trapiantati di rene (13), riscontrando una percentuale significativa di immunoglobuline (Ig) di tipo G e di tipo A rispetto ai controlli sani nei pazienti dializzati;

per le malattie intestinali si pensa un possibile coinvolgimento nelle patologie croniche, studi attualmente in corso stanno raccogliendo dati sulla presenza del microrganismo soprattutto in pazienti con morbo di Crohn e retto-colite ulcerosa.

Scopo della presente tesi è stato quello di valutare la presenza di anticorpi anti-*S. negevensis* e anti-*C.pneumoniae* in pazienti sottoposti a endoarteriectomia carotidea, avendo a disposizione anche il tessuto rimosso durante l'intervento di routine è stato possibile valutare anche la presenza di DNA dei microrganismi stessi.

Chlamydia pneumoniae

1.1 Definizione e classificazione

Chlamydia pneumoniae fa parte della famiglia delle *Chlamydiaceae* contenente un solo genere, *Chlamydia* e nove specie ben note: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia suis*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia caviae*. Inoltre, negli ultimi anni sono state scoperte due nuove specie: *Chlamydia avium* e *Chlamydia gallinacea*, arrivando quindi a undici specie.

C. pneumoniae è stata isolata per la prima volta come TW-183 a Taiwan nel 1965, e successivamente come AR-39 nel 1983 a Seattle. Nel 1986, fu descritta per la prima volta come causa di infezioni acute del tratto respiratorio, e chiamato con l'acronimo TWAR (Taiwan acute respiratory). TWAR è stato dichiarato più tardi una nuova specie di clamidia e rinominato *C. pneumoniae* nel 1989 (14).

1.2 La cellula batterica

I batteri appartenenti all'ordine *Chlamydiales* sono dei microrganismi particolari, assimilabili ai virus per il loro parassitismo obbligato, e ai batteri per la modalità di replicazione, la suscettibilità agli antibiotici, e la presenza al loro interno di DNA, RNA e ribosomi simili a quelli dei batteri. Dal punto di vista metabolico sono in grado di sintetizzare autonomamente varie sostanze organiche a basso peso molecolare.

Il difetto metabolico principale, causa del loro parassitismo endocellulare obbligato, è rappresentato dall'assenza di qualsiasi sistema enzimatico per la produzione di energia (ATP), pertanto sono costrette a rifornirsi di ATP e degli altri cofattori (NAD, CoA, ecc.) dalla cellula ospite. La struttura batterica è paragonabile a quella dei batteri Gram-negativi, con una seconda membrana che, nella porzione esterna, presenta la caratteristica componente lipopolisaccaridica (endotossina o LPS) e dalle proteine OMPs (*Outer Membrane Proteins*). La proteina principale è indicata con l'acronimo MOMP (*Major Outer Membrane Protein*), che ha una funzione strutturale e metabolica in quanto agisce da porina, permettendo l'ingresso di nutrienti e molecole essenziali.

Abbastanza singolare è l'assenza della componente peptidoglicanica della parete cellulare, sostituita da uno strato di proteine ricche in cisteina (sono due proteine da 60 kDa e da 15 kDa, chiamate rispettivamente *large* e *small* CRP o *cystein-rich protein*) che sembra rappresentare un equivalente funzionale del peptidoglicano, conferendo rigidità alla membrana esterna tramite ponti disolfuro inter- e intra-molecolari tra le proteine stesse (figura 3).

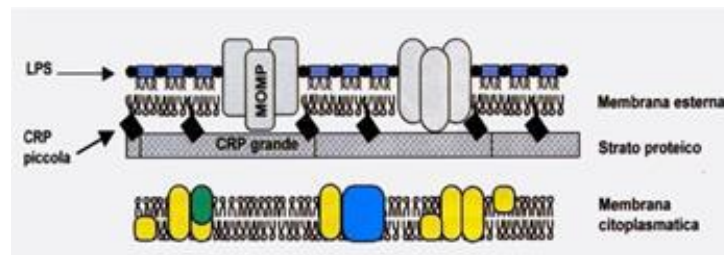


Figura 3. Struttura della parete cellulare (Immagine tratta da 'La Placa')

Alla particolare struttura degli involucri esterni sembra collegata la capacità di questi microrganismi di impedire la fusione con i lisosomi, del fagosoma nel quale sono introdotte all'interno della cellula parassitata. L'assenza di una parete formata da peptidoglicano spiega la loro scarsa o nulla sensibilità agli antibiotici beta-lattamici (e comunque ai farmaci che agiscono impedendo la sintesi del peptidoglicano) (15).

1.3 Ciclo biologico

Le *Chlamydiae* presentano un caratteristico ciclo vitale dimorfico, che si svolge nell'arco di 48-72 ore, caratterizzato dall'alternarsi di due entità morfologiche e funzionali: il *corpo elementare* (CE) e il *corpo reticolare* (CR) (Figura 4).

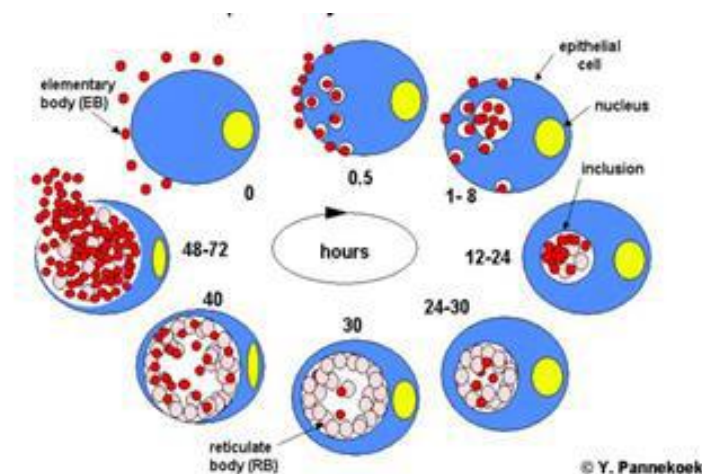


Figura 4. Ciclo vitale delle Chlamydie (Y. Pannekoek (16))

Il *corpo elementare*, di piccole dimensioni (200-300 nm di diametro), di forma rotondeggiante (piriforme in *C. pneumoniae*), rappresenta la forma infettante, trasmissibile da una persona all'altra, priva di capacità replicativa, resistente e stabile in ambiente extracellulare. Il *corpo reticolare*, di maggiori dimensioni (1000-1500 nm di diametro), presenta una chiara organizzazione cellulare procariotica, è metabolicamente attivo, si moltiplica attivamente per scissione binaria, non è infettante ed è caratterizzato da un'estrema fragilità in ambiente extracellulare. Il ciclo replicativo permette la perpetuazione dell'infezione da una cellula permissiva ad un'altra nell'individuo infettato. Inizia con la penetrazione del CE nella cellula eucariotica mediante endocitosi. Durante questa fase il CE risiede all'interno del fagosoma dove, nell'arco di 4-8 ore dall'infezione va incontro ad un processo riorganizzativo, che si appalesa in un aumento di volume (600-1000nm di diametro) e si trasforma nel CR, che si moltiplica attivamente per scissione binaria. Dopo un certo numero di divisioni, le particelle accumulate nel vacuolo fagosomiale costituiscono una vera e propria colonia evidente come un'inclusione citoplasmatica caratteristica che si colora in bruno con soluzione iodo-iodurata di Lugol per la presenza di una matrice glicogenica, di aspetto reticolare in *C. trachomatis* e di aspetto compatto nelle cellule infettate dalle altre specie di *Chlamydiae*.

Tra la 18^a e la 24^a ora dall'infezione, alcuni CR vanno incontro ad un processo di riorganizzazione del materiale protoplasmatico con progressiva riduzione delle loro dimensioni che porta nuovamente alla formazione dei CE. Nelle ultime fasi del ciclo (dalla 48^a ora), in seguito alla lisi della cellula parassitata e la rottura della membrana del fagosoma, i CE vengono liberati e danno inizio ad un nuovo ciclo infettante. Per potersi moltiplicare il microrganismo ha sviluppato delle particolari capacità: l'inibizione fagolisosomiale ed il controllo dell'attività apoptotica della cellula. Le *Chlamydiae* inviano dei segnali anti apoptosi all'inizio del ciclo e dei segnali pro apoptosi alla fine per facilitare la fuoriuscita dei CE neoformati. Oltre ai CE e ai CR sono stati messi in evidenza, sia *in vitro* sia *in vivo*, i cosiddetti "corpi aberranti" che rappresentano una forma di latenza, non coltivabile, e sarebbero responsabili della persistenza e della cronicità dell'infezione. I corpi aberranti, da 10 a 100 volte più grandi dei CR, sono sprovvisti di MOMP.

Lo stato persistente osservato nelle infezioni da *C. pneumoniae* è forse il più importante aspetto della biologia di questo microrganismo che è stato esaminato per la comprensione dei collegamenti tra questo patogeno e i disturbi evidenziati nell'uomo, soprattutto nel caso

di asintomaticità e cronicità (17). Questo stato non è ancora stato definitivamente dimostrato *in vivo*, ma si pensa essere il motivo principale per l'intrattabilità nel trattamento delle infezioni da clamidia. Lo stato persistente è caratterizzato da corpi reticolari allargati e pleomorfi, chiamati corpi aberranti. La persistenza potrebbe essere considerata uno stato sospeso dell'infezione, questo perché i corpi aberranti non si replicano all'interno dell'inclusione, nonostante avvenga la trascrizione e replicazione del cromosoma (69). La persistenza *in vitro* è indotta da svariati meccanismi incluso il trattamento antibiotico, la mancanza di nutrienti e/o triptofano, limitazione del ferro, attacco dell'IFN- γ e infezione fagica (18).

1.4 Genoma

Il primo genoma sequenziato di *Chlamydia* fu quello di *C. trachomatis* (serovar D) nel 1998. Nei soli due anni successivi alla pubblicazione del primo genoma di *C. trachomatis*, quattro ceppi di *C. pneumoniae* furono sequenziati, appurando che il suo genoma è più lungo di 214 geni, includendo un set più esteso di geni codificanti per proteine polimorfiche della membrana esterna.

L'intero genoma dei quattro ceppi umani di *C. pneumoniae* è disponibile da oltre 15 anni (19) (20), e i paragoni tra questi quattro ceppi rivelano una sintenia notevole con essenzialmente il 99% di identità nel loro contenuto e arrangiamento genico. È interessante, che di 1073 geni della *C. pneumoniae* umana, 186 geni sono *C. pneumoniae*-specifici, non avendo omologi in nessun altro organismo, comprese le altre specie di clamidia.

Il sequenziamento del primo ceppo animale di *C. pneumoniae*, LPCoLN del koala, fornì una nuova prospettiva sull'infezione da *C. pneumoniae*. Sebbene il core genomico del biovar LPCoLN condivida un'alta identità con tutti i ceppi umani, il cromosoma da solo è attorto alle 12 kb più largo e contiene molti geni completi, che sono troncati nei ceppi umani. In aggiunta, LPCoLN ha molti geni ceppo-specifici e un plasmide extracromosomico che non è stato descritto nei ceppi umani. Queste caratteristiche forniscono supporto per almeno una trasmissione zoonotica di *C. pneumoniae* da animale a uomo almeno una volta in passato.

C. pneumoniae ha alcune differenze chiave rispetto ai geni per la virulenza e patogenicità confrontata ad altre specie di clamidie. Probabilmente la più importante caratteristica del genoma di *C. pneumoniae* è l'assenza del gene per il recupero del triptofano o il pathway di

biosintesi, inclusi i geni *trpABCR* presenti in *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, e *C. caviae* (21) (22). L'assenza di questi geni lascia *C. pneumoniae* completamente dipendente alle riserve di triptofano dell'ospite e perciò vulnerabile alle difese immunitarie dell'ospite per l'attacco dell'INF- γ . Questo mediatore immunitario può eliminare il microrganismo attraverso la deplezione del triptofano (23). Nonostante l'assenza di questi importanti geni di sintesi, *C. pneumoniae* è capace di sopravvivere e di eludere il sistema immunitario dell'ospite, attraverso meccanismi non ancora perfettamente conosciuti. Uno di questi meccanismi potrebbe essere trovato nel gene *Cpn1046* di *C. pneumoniae*, *phhA*, che codifica per un'idrolasi legata a un aminoacido aromatico (Aro-AAH), i quali substrati sono tre aminoacidi aromatici (fenilalanina, tirosina e triptofano), ipotizzando un potenziale pathway di recupero amminoacido/triptofano (24). Inoltre, *C. pneumoniae* codifica per dei geni per il recupero di purine e pirimidine così come un pathway per una completa sintesi della biotina (20), che non sono presenti nei genomi delle altre clamidie, fornendo un meccanismo per sopravvivere durante il blocco dei nutrienti da parte dell'ospite.

Sei delle specie di clamidia hanno un plasmide extracromosomico e dei 5 isolati completamente sequenziati di *C. pneumoniae*, solo uno, il ceppo LPCoLN, possiede il plasmide extracromosomico (25). I plasmidi delle clamidie hanno varie taglie, ma tutti contengono gli otto open reading frame e un alto grado di similitudine tra le specie (26). Inoltre, AR39, un ceppo respiratorio umano, porta il batteriofago ϕ CPAR39 (19). È stato dimostrato che questo batteriofago non infetta solo *C. pneumoniae*, ma anche *C. abortus*, *C. pecorum*, e *C. caviae*, e può trasmettersi a isolati di *C. pneumoniae* batteriofagi-negativi.

Esistono inoltre delle differenze nelle regioni codificanti le proteine di membrana, che contribuiscono enormemente alla diversità tra i genomi delle clamidie. Il gene codificante la proteina di membrana maggiore esterna (*ompA*) codifica per un componente maggiore della membrana dei corpi elementari delle clamidie (27). La diversità di sequenza all'interno dei quattro domini variabili (VD) di *ompA* determina i sierotipi, o identità antigenica, della parte infettante, con il numero di sierotipi riconosciuti che variano all'interno delle specie di clamidie. Nonostante per *C. pneumoniae* viene riconosciuto un solo genotipo per *ompA*, ulteriori studi hanno dimostrato qualche variazione genetica in VD4 così come una variazione antigenica tra i vari ceppi. Un'altra famiglia di proteine che possono essere riscontrate in tutte le specie di clamidie sono le proteine polimorfiche di membrana (Pmps), queste sono una famiglia di proteine autotrasportatrici e condividono una similarità di sequenza con il sistema di secrezione tipo V dei batteri Gram-negativi (28). Il numero delle

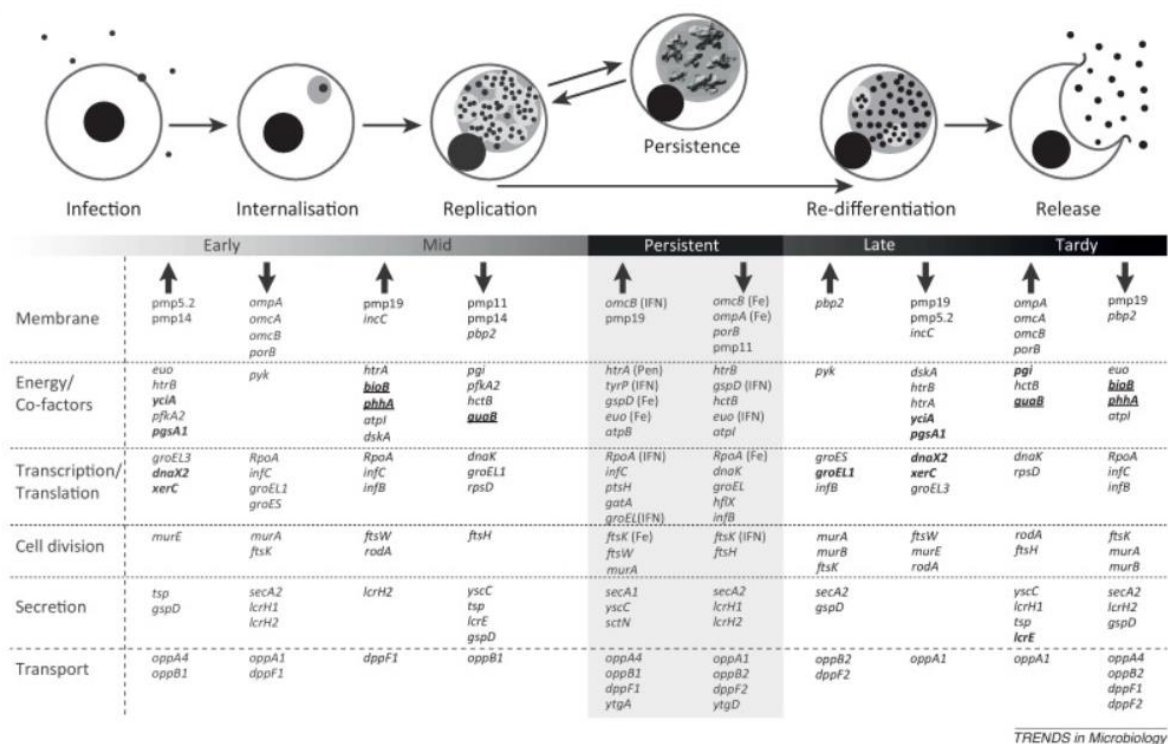
Pmps per specie è variabile, comunque tutti i geni tendono a raggrupparsi in regioni specifiche del genoma (29). Il confronto dell'intero genoma tra *C. trachomatis* serovar D e *C. pneumoniae* CWL029 dimostrano una sequenza addizionale di 187 kb in *C. pneumoniae*, il 22% di questa extra sequenza codifica per un numero espanso di Pmp omologhe – 21 in *C. pneumoniae* in paragone alle nove in *C. trachomatis* (20).

Un altro indicatore della diversità genetica all'interno delle clamidie è la presenza di un sistema di secrezione di tipo 3 (T3SS). Si pensa che il T3SS derivi da un sistema proteico flagellare (30). L'organizzazione strutturale dei geni del T3SS è altamente conservata all'interno degli organismi con un T3SS, probabilmente il risultato di un trasferimento orizzontale del gene (31). Le clamidie sono le uniche, non appartenenti al phylum dei proteobatteri, che possiedono un T3SS (32) e i geni che codificano per il T3SS delle clamidie e i suoi effettori associati si trovano in almeno 4 raggruppamenti all'interno di tutto il cromosoma batterico (33). La posizione e l'organizzazione dei tre cluster dei geni strutturali sembrano essere conservati in tutte le specie, ma l'organizzazione dei geni effettori in *C. pneumoniae* differisce notevolmente da *C. trachomatis*. Il gruppo che contiene il fattore di attività simil-proteasica delle clamidie (CPAF) e i geni strutturali *cop* sono invertiti in entrambe le direzioni di lettura e di organizzazione. In aggiunta, *C. pneumoniae* mostra una duplicazione e un riarrangiamento dei geni effettori *inc* e possiede una singola copia del gene effettore *ca530*, che è assente in *C. trachomatis* (33). Oltretutto, la famiglia Inc degli effettori del T3SS è espansa in *C. pneumoniae*, con 92 proteine Inc paragonate alle 55 di *C. trachomatis* (34). È stato dimostrato che le proteine Inc sono coinvolte nell'iterazione tra la clamidia e la cellula ospite a livello nel momento dell'inclusione in membrana, ed è stato mostrato che interagisce con le GTPasi Rab della cellula ospite. Poiché le proteine Rabs della cellula ospite sono largamente responsabili del rimodellamento dell'apparato di Golgi, è ragionevole che i diversi membri delle clamidie abbiano diverse interazioni tra le proteine Inc con le Rabs, contribuendo a un'interazione specie-specifica con l'ospite e una diversa acquisizione dei nutrienti (35).

Non sono da sottovalutare inoltre, gli studi genetici sulla persistenza in *C. pneumoniae*, che hanno mostrato che come in un'infezione, *C. pneumoniae* modula il macchinario apoptotico e metabolico dell'ospite, up-regolando geni coinvolti come nei pathway di NF-κB e delle tirosin-chinasi, o down-regolando i geni coinvolti nelle modificazioni del citoscheletro dell'ospite. Il metodo con il quale viene indotta la persistenza gioca un ruolo importante nel determinare la regolazione dei geni in *C. pneumoniae*. Durante la persistenza antibiotico-

mediata, i geni per la replicazione del DNA sono espressi a livelli normali, ma le citochine (*ftsK* and *ftsW*) e le heat-shock proteins sembrano essere down-regolate (36) (37). In un modello di persistenza indotta dal ferro però, l'espressione genica di *ftsK* rimane normale (38). In un modello di persistenza da INF- γ , i geni coinvolti con la glicolisi e la sintesi del peptidoglicano sono up-regolate, mentre la trascrizione di numerosi geni del T3SS è alterata (39) (40). I geni coinvolti negli stadi tardivi dello sviluppo di *C. pneumoniae*, i geni per le proteine di membrana esterna, e ipoteticamente i geni presenti nei corpi elementari, rimangono up-regolati, probabilmente per accelerare il differenziamento e lo sviluppo subito dopo la rimozione dell'INF- γ (40). I modelli di persistenza variano largamente anche in base al tipo di cellule infettate come mostrato dall'effetto divergente della disponibilità di ferro in cellule epiteliali e monociti infettati con *C. pneumoniae*, con una diminuzione significativa del numero di cellule infettate e del numero di inclusioni nelle cellule epiteliali ma non nei monociti (41).

Nella figura 5 abbiamo una selezione di geni e dei loro profili di espressione durante le diverse fasi del ciclo delle clamidie (42).



TRENDS in Microbiology

Figura 5. Alcuni geni espressi durante le fasi del ciclo biologico delle clamidie

1.5 Sensibilità ai farmaci

L'assenza di una parete cellulare formata da peptidoglicano spiega la scarsa o nulla sensibilità agli antibiotici beta-lattamici delle *Chlamydie*, nei cui confronti i farmaci di elezione sono le tetracicline, sono attivi anche i macrolidi ed i chemioterapici chinolonici.

Il trattamento antibiotico per *C. pneumoniae* è molto simile a quello del *Mycoplasma pneumoniae*. Consiste in una terapia per due settimane con macrolidi, tetracicline come la doxiciclina, o fluorochinoloni. Azitromicina e claritromicina sono un'opzione alternativa all'eritromicina per l'aumentata tolleranza intestinale. Nel caso di pazienti intolleranti ai macrolidi o alle tetracicline, i fluorochinoloni come levofloxacinina o moxifloxacinina sono delle ottime alternative.

1.6 Sieroprevalenza

L'infezione è molto diffusa e la presenza di anticorpi è dimostrabile nella maggior parte dei soggetti che abbiano superato l'adolescenza. Questi anticorpi si sono però dimostrati spesso incapaci di neutralizzare i batteri. Approssimativamente il 50% di giovani adulti e il 75% di persone anziane hanno evidenze sierologiche di una precedente infezione.

È stato riportato in numerosi studi che fino al 20% delle polmoniti da comunità (o CAP) è causato da *C. pneumoniae*. La maggior parte di questi dati è basata sulla sierologia, e il soggetto di dibattito è proprio la relazione tra questo microrganismo e l'eziologia delle CAP. Cillóniz et al. hanno trovato che le CAP erano causate da *C. pneumoniae* solo nel 3% dei casi. Chalmers et al. hanno riscontrato un massimo del 2.2% di CAP causate da *C. pneumoniae*. Lo studio di Arnold et al. ha mostrato che l'incidenza di CAP dovuta a *C. pneumoniae* da 4337 pazienti era dell'8% in Nord America, 7% in Europa, &% in America Latina, e 5% in Asia. Lui et al. In uno studio prospettico osservazionale di pazienti ospedalizzati con CAP, riportava che il 29% dei casi con eziologia definita, erano causati da patogeni intracellulari; di questi, il 35% sono stati classificati come PSI IV-V (Pneumoniae Severity Index), in 5% di questi casi è stato necessario il ricovero nel reparto di terapia intensiva, e il tasso di mortalità era del 2,2% nel gruppo atipico. Uno studio dalla Thailandia su CAP severe ha riportato che l'incidenza di polmoniti da *C. pneumoniae* era di 3-23 casi ogni 100,000 all'interno della popolazione; i tassi più alti erano per i pazienti sotto l'anno di vita (18-166 casi su 100,000) e per quelli con età dai 70 anni in su (23-201 casi su 100,000).

Il tasso di mortalità associato all'infezione da *C. pneumoniae* è basso. Comunque sia, se i primi segni delle alte vie respiratorie associati all'infezione da *C. pneumoniae* non vengono trattati, si può incorrere a problemi più gravi o addirittura la morte (43).

1.6.1 Età di acquisizione

L'età di acquisizione di questa infezione è molto precoce, anche per questo è stato ipotizzato un suo ruolo in patologie con un continuo processo infiammatorio attivo come l'aterosclerosi.

1.6.2 Patologie associate

C. pneumoniae è soprattutto un patogeno respiratorio, causa di una forma di modesta gravità di polmonite comunitaria. La maggior parte delle infezioni sono asintomatiche o con andamento clinico benigno e autolimitante, anche se con tendenza alla cronicizzazione. Nei soggetti anziani o con malattie respiratorie preesistenti, la polmonite può assumere aspetti clinici di maggiore gravità. Negli anni sono stati eseguiti numerosi studi che valutano la possibile associazione tra questo microrganismo e l'asma, sia in adulti che bambini.

Nonostante originariamente sia stato identificato come un patogeno respiratorio acuto, è affascinante notare come la maggior parte delle ricerche su *C. pneumoniae* siano concentrate nel ruolo di questo patogeno come causa di infezioni persistenti in patologie croniche dell'uomo. I primi tentativi fatti erano basati sull'ipotesi che *C. pneumoniae* potrebbe essere collegata a patologie cardiovascolari dell'uomo (44) (45). Successivamente, l'infezione da *C. pneumoniae* è stata studiata in una moltitudine di patologie, incluso malattia di Alzheimer (46), artrite (47), cancro del polmone (48) e diabete (49).

Simkania negevensis

2.1 Definizione e classificazione

Per anni nell'ordine delle *Chlamydiales* era presente una sola famiglia, quella delle *Chlamydiaceae*, contenente un solo genere, *Chlamydia*, e nove specie. Recentemente (1999), l'introduzione dei dati dell'analisi filogenetica degli RNA ribosomali 16S e 23S negli studi di tassonomia, ha portato notevoli rimaneggiamenti nell'ordine *Chlamydiales* con il riconoscimento di quattro gruppi distinti di *Chlamydiae*, inquadrati a livello di "famiglia" (50).

Nella nuova classificazione (figura 6), la famiglia *Chlamydiaceae* riunisce le *Chlamydiae* già note. Altre tre famiglie, create per inquadrare tassonomicamente i nuovi batteri "Chlamydia-like" scoperti recentemente, sono rappresentate dalla famiglia *Parachlamydiaceae* con due specie *Parachlamydia acanthamoebae* e *Neochlamydia hartmannellae*, dalla famiglia *Waddliaceae* con l'unica specie *Waddlia chondrophila* e dalla famiglia *Simkaniaceae* con l'unica specie *Simkania negevensis*. Queste nuove famiglie presentano un'omologia superiore all'80% per le sequenze dei geni per gli rRNA 16S di *Chlamydia*.

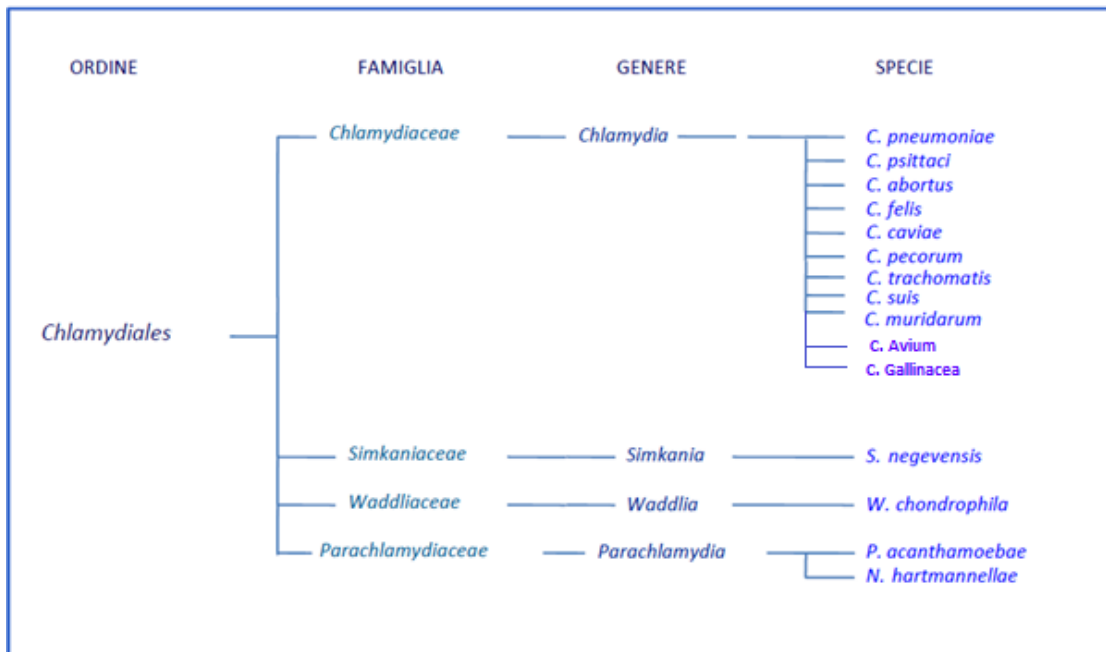


Figura 6. Classificazione schematica dell'ordine *Chlamydiales*

Simkania negevensis è stata descritta per la prima volta come “microorganismo Z simile a clamidia”. È un microrganismo, Gram-negativo, appartenente alla famiglia *Simkaniaceae* dell'ordine *Chlamydiales*, infatti ciò che lo accomuna ai membri di quest'ordine è il ciclo di sviluppo caratteristico che comprende l'alternarsi delle due forme morfologiche, il corpo elementare e il corpo reticolare.

Ciò che contraddistingue *S. negevensis* dai batteri appartenenti alla famiglia *Chlamydiales* è un genoma di dimensioni maggiori e un introne di gruppo I nel 23S rRNA; presenta, inoltre, un ciclo di sviluppo più lungo e una diversa sensibilità ai farmaci.

S. negevensis fu individuata per la prima volta come contaminante di colture cellulari, in cui si potevano evidenziare particelle dotate di rapido movimento, le amebe. Quindi, vista questa caratteristica che permette al batterio di moltiplicarsi anche all'interno di amebe, e non solo di colture cellulari di mammiferi ha fatto nascere l'ipotesi che l'acqua domestica possa rappresentare una fonte di infezione.

I pochi studi sieroepidemiologici svolti finora hanno evidenziato una prevalenza abbastanza importante in Israele, nel Nord America e in Europa occidentale, ma una bassa prevalenza in Giappone. L'infezione da *S. negevensis* è stata associata a bronchioliti nei bambini e negli adulti a polmoniti di comunità ad esacerbazioni della broncopneumopatia cronica ostruttiva.

1.2 La cellula batterica

Il pattern polipeptidico di *S. negevensis* ottenuto tramite SDS PAGE, è piuttosto diverso da quello di altri membri delle *Chlamydiales*. Solo alcune proteine, principalmente dello shock termico, sono condivise da *S. negevensis*, *W. chondrophila*, *P. acanthamoebae*, *C. pneumoniae* e *C. trachomatis*.

L'analisi con l'immunoblot dei lisati cellulari di *S. negevensis*, mediante siero murino iperimmune mostra degli antigeni di membrana predominanti, che sono un set di tre bande di peso molecolare tra i 37-42 kDa, e bande addizionali di 26, 52, 58, e 64 kDa, e una banda di PM maggiore, di 100 kDa.

Anticorpi monoclonali (MAbs) preparati contro gli organismi interi o contro i lisati cellulari, reagiscono soprattutto con il set di bande tra i 37 e i 42 kDa, indice di forte immunogenicità

del complesso. Alcuni di questi MAbs sono stati capaci di neutralizzare *S. negevensis* in vitro, ma incapaci di neutralizzare *C. trachomatis* nelle stesse condizioni. Quando questi MAbs specifici per *S. negevensis* sono stati testati tramite immunoblot su preparati di lisati cellulari o di membrana di *C. trachomatis*, essi erano in grado di riconoscere un epitopo localizzato sulla proteina OmpA. Dall'altro lato, i MAbs che riconoscono gli epitopi famiglia-specifici di OmcB (OMP-2), OmpA (MOMP), e LPS non legano antigeni di *S. negevensis*. La struttura e la funzione dei tre polipeptidi appartenenti al complesso esterno di membrana di *S. negevensis* ha bisogno di ulteriori approfondimenti. È possibile che gli epitopi condivisi costituiscano parte di una porina comune alle *Chlamydiaceae* e a *S. negevensis* (10).

Gli studi effettuati in seguito da Yamaguchi confermano i dati presentati in letteratura qualche anno prima, dove è stato utilizzato il western blot come test di conferma per sieri umani risultati positivi con la tecnica della microimmunofluorescenza per *S. negevensis*. Questi sieri, positivi per la presenza delle IgG anti *S. negevensis*, reagivano con diversi antigeni: 110, 94, 64, 57, 46, e 24 kDa. Inoltre, si può supporre che gli anticorpi anti-*S. negevensis* reagiscono maggiormente contro gli antigeni con peso molecolare di 64 kDa (figura 7), probabilmente il maggior target della risposta immune di tipo umorale verso *S. negevensis* (51).

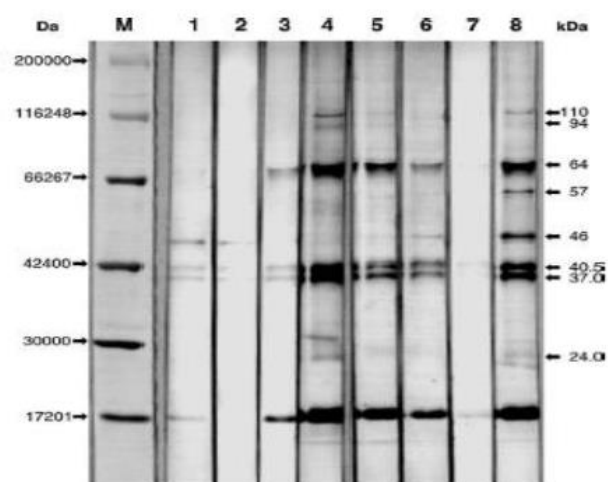


Figura 7. Pattern polipeptidico di *S. negevensis*. Sieri negativi in MIF (corsa 1-2), sieri positivi in MIF (corsa 3-6), siero di controllo negativo (corsa 7) e siero di controllo positivo (corsa 8)

1.3 Ciclo biologico

Il ciclo replicativo di *S. negevensis* differisce alquanto dal tipico ciclo di sviluppo all'interno delle inclusioni mostrato dalle altre clamidie.

Il ciclo biologico di *S. negevensis* ha anche delle somiglianze a quello dei membri delle *Chlamydiaceae* in quanto sono stati osservati con la microscopia elettronica sia i CE che i CR. Evidenziata però la presenza di un genoma di dimensioni maggiori è inevitabile riscontrare anche delle differenze che sottolineano la sua distanza filogenetica dalle altre *Chlamydiaceae*. Infatti, i CE risultano di diametro 0.2-0.3 μm (figura 8b), con parti elettrone-lucenti, oltre alle parti elettrone-dense con il DNA condensato. Le forme replicative risultano simili ai CR delle clamidie, con diametro di 0.3-0.7 μm (figura 8a). Inoltre, sono state evidenziate delle forme intermedie, definite a semiluna (figura 8c).

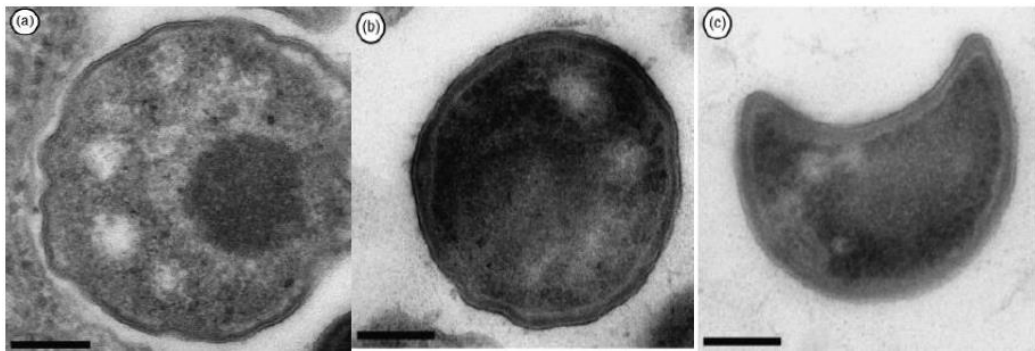


Figura 8. Immagine al microscopio: (a) corpo reticolare, (b) corpo elementare, (c) corpo a semiluna.

I CR rimangono le uniche forme ad andare incontro a scissione binaria, ma è stato evidenziato che a differenza delle clamidie, queste forme in *S. negevensis* risultano infettanti. Questo può essere spiegato dalle maggiori dimensioni del genoma, al cui interno possono essere presenti geni che aumentano la stabilità dei CR, rendendo così tutte le forme morfologiche infettanti (52) (53).

Cellule infettate con *S. negevensis* mostrano inclusioni piccole e di gran numero superiore a quelle che possono presentarsi in cellule infettate con *C. trachomatis*.

Il ciclo replicativo di *S. negevensis* (figura 9), valutato con saggi di infettività, si presenta con un periodo di 2-3 giorni di rapida crescita, che è tipico delle altre specie di clamidie, seguito da una fase stazionaria di 8 o più giorni durante la quale l'infettività aumenta e poi decresce solo marginalmente. Durante il periodo di crescita esponenziale di 3 giorni, il citoplasma delle cellule infettate mostra delle macchie scure, che sembrano essere piccoli

vacuoli. Successivamente, le cellule diventano costellate da vacuoli angolari che all'inizio sembrano essere vuoti, ma dal giorno 7 al giorno 12 vengono riempiti con particelle fluttuanti in movimento. Infine, nei giorni 12-14 i monostrati di cellule risultano distrutti.

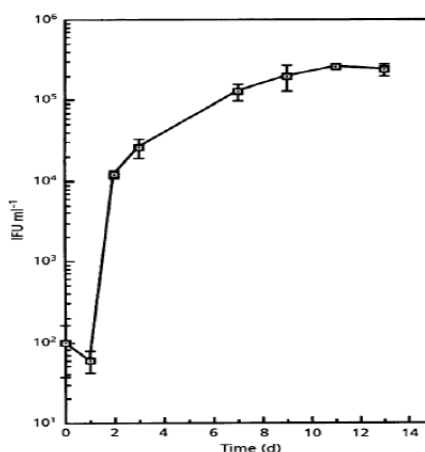


Figura 9. Curva di crescita di *S. negevensis*

Il ciclo replicativo di *S. negevensis* risulta quindi più lungo rispetto a quello delle *Chlamydiaceae*, dove per esempio *C. trachomatis* induce la lisi cellulare dopo pochi giorni dall'infezione e le cellule vicine che non sono ancora state infettate, vengono infettate rapidamente (52).

L'infezione da *S. negevensis* può essere attiva, persistente o criptica. Nell'infezione attiva si osservano effetti citopatici, una progenie infettante, ed è possibile rilevare il DNA con la PCR, così come si può rilevare l'induzione della secrezione di citochine infiammatorie (IL-6/IL-8); nelle infezioni persistenti non abbiamo un effetto citopatico, con una certa infettività, e la presenza di DNA, e anche qui possiamo avere secrezione di citochine infiammatorie; nelle infezioni criptiche, non abbiamo né effetto citopatico né infettività, sebbene si possono trovare DNA e secrezione di citochine.

Studi dimostrano, inoltre, come *S. negevensis* possa infettare culture cellulari umane di vari tessuti d'origine: cellule del tratto respiratorio (BEAS-2B), cellule del tratto gastrointestinale (HT-29), cellule del tratto genitale (HEC-1A), e cellule endoteliali (HUVEC).

Questa versatilità della capacità d'infezione che l'organismo mostra potrebbe avere implicazioni per potenziali organi target durante la naturale infezione *in vivo*.

Infezioni persistenti possono presentarsi anche spontaneamente in alcune colture cellulari, come le HT-29 (cellule del carcinoma del colon) e le HEC-1A (cellule del tratto genitale), o possono essere anche indotte artificialmente tramite la deplezione del ferro (11).

1.4 Genoma

Il genoma di *S. negevensis* ceppo ZT risulta molto più grande rispetto al genoma dei ceppi appartenenti alla famiglia *Chlamydiaceae* infatti le sue dimensioni sono quasi il doppio (1.7 Mbp) rispetto al genoma delle clamidie, che si aggira intorno a 1Mbp.

Il contenuto di basi puriniche (G + C) nel genoma di *S. negevensis* è pari al 42.5 mol%. Anche nei ceppi appartenenti alla famiglia *Chlamydiaceae* è presente un contenuto simile di queste basi. Questi dati stanno a conferma del fatto che *Simkaniaceae* e *Chlamydiaceae* hanno un antenato comune (54). Nonostante, siano presenti alcuni studi sulla sieroprevalenza delle infezioni da *S. negevensis*, sono poco note le basi molecolari della vita intracellulare del microrganismo. Sono state studiate le interazioni metaboliche con la cellula ospite di *S. negevensis* nei confronti del parassitismo nucleotidico. Sono stati identificati quattro geni codificanti per proteine di trasporto dei nucleotidi (NTTs) nel genoma di *S. negevensis* (dal *SnNTT1* al *SnNTT4*), e tutti tranne uno (*SnNTT4*) mostrano un'alta omologia di sequenza con le proteine di trasporto dei nucleotidi delle clamidie.

Tramite tecniche molecolari di trascrittasi inversa (RT-PCR) è stato possibile evidenziare che questi trasportatori vengono trascritti attivamente durante il ciclo di crescita all'interno della cellula ospite.

Inoltre, mediante espressione eterologa in *Escherichia coli*, è stato possibile individuare i rispettivi substrati per queste proteine di trasporto di nucleotidi. *SnNTT1* agisce come antiporto ATP/ADP, *SnNTT2* agisce come simporto di nucleotidi guaninici/ATP/H⁺ guidato dal potenziale di membrana, *SnNTT3* come antiporto per nucleotidi trifosfato, e solo per *SnNTT4* non è stato ancora identificato il substrato. È presente un'elevata omologia di sequenze per questi trasportatori nucleotidici (tranne per *SnNTT4*) di *S. negevensis* e quelli presenti in tutte le famiglie. La differenza principale tra questi NTTs è il numero delle isoforme, infatti nelle *Simkaniaceae* ci sono quattro isoforme, come visto finora, nelle *Chlamydiaceae* due isoforme e nelle *Parachlamydiaceae* e *Waddliaceae* cinque (55).

Una caratteristica peculiare nel genoma di *S. negevensis* è la presenza di introni di gruppo I nel 23 S rDNA. Questa recente scoperta è stata evidenziata anche in *Coxiella burnetii*.

Gli introni di gruppo I costituiscono una classe distinta di ribozimi, caratterizzati da una struttura conservata primaria e secondaria e capaci di self-splicing o assistito da proteine. Molti introni di gruppo I portano anche sequenze ORFs che codificano per homing endonucleasi, che li rendono mobili (56). Sostanzialmente appena l'introne entra nella cellula, queste endonucleasi vengono espresse e accompagnano l'inserimento dell'introne nel DNA della cellula ospite attraverso il clivaggio di siti target. Prima di questa scoperta, sulla presenza di introni di gruppo I nel 23S rDNA batterico, erano presenti incongruenze di informazioni, considerando che in quasi tutti i 23 S rDNA sono presenti delle sequenze target per le endonucleasi *I-Ceu* e *I-Cpa* codificate dall'introne.

Questi introni di gruppo I del 23 S rDNA sono invece molto diffusi nei cloroplasti delle alghe e nei mitocondri delle amebe e in altri eucarioti poco evoluti.

L'introne di gruppo I SnLSU ·1, presente in *S. negevensis* (figura 10), è il primo introne di gruppo I che è stato trovato nel rDNA batterico e il solo introne di gruppo I che non subisce lo *splicing*. EndA, che è codificata da SnLSU ·1 e che potrebbe essere l'endonucleasi funzionale, risulta strettamente collegata a endonucleasi espresse da introni di gruppo I presenti in cloroplasti e mitocondri.

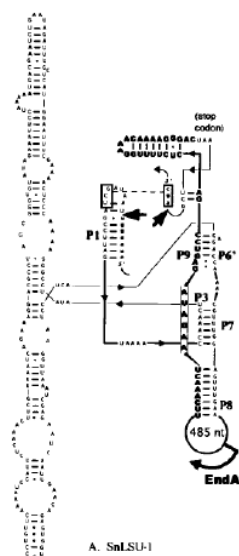


Figura 10. Introne di gruppo I di *S. negevensis*

Considerando che *S. negevensis* è un batterio intracellulare obbligato, potrebbe aver acquisito l'introne in rDNA attraverso un trasferimento orizzontale dall'ospite eucariote.

Questo trasferimento genetico tra organelli di SnLSU ·1 potrebbe avvenire tra clamidie, cloroplasti, mitocondri o altri endosimbionti in amebe (57).

Ipotesi plausibile visto che è stato dimostrato che *S. negevensis* è capace di sopravvivere e proliferarsi all'interno delle amebe (8).

1.5 Sensibilità ai farmaci

S. negevensis come gli altri appartenenti al genere *Chlamydiales* risulta sensibile a macrolidi e tetracicline (inibitori della sintesi proteica), ma non alla penicillina. *S. negevensis* risulta resistente alla bacitracina, ma sensibile alla D-cicloserina; entrambi questi farmaci sono inibitori della sintesi del peptidoglicano. Esperimenti di ibridazione utilizzando come sonde DNA codificante per le proteine che legano la penicillina a *C. trachomatis* (PBP) mostrano la presenza di DNA omologo in *S. negevensis*. Comunque, in esperimenti preliminari usando penicillina triziata si è osservata solo una PBP (con peso molecolare di 46 kDa). Il perché del fatto che le PBP di *S. negevensis* non vengono trascritte o non hanno siti di legame per la penicillina rimane ancora da scoprire. Esperimenti preliminari indicano che azitromicina, minociclina ed eritromicina sono i farmaci inibitori e battericidi più efficaci in cellule Vero trattate con cicloeximide. doxiciclina e ofloxacina sono moderatamente inibitori e battericidi, mentre ciprofloxacina è meno efficace (58).

È stato dimostrato, inoltre, che *S. negevensis* è resistente ad alte concentrazioni di interferon gamma (superiori a 400 unità/ml), fatta crescere in cellule Hep-2, mentre la crescita della maggior parte dei ceppi di *C. trachomatis* è inibita da questa citochina effettrice. Dall'altro lato, la crescita di *S. negevensis* è inibita da concentrazioni di fattore di necrosi tumorale (TNF) α che inibiscono anche la crescita di *C. trachomatis* in L2/434/Bu. Questi risultati preliminari risultano di particolare interesse, dato che si è visto che *S. negevensis* può crescere piuttosto bene in cellule prive di triptofano, indicando che l'organismo potrebbe essere capace di sintetizzarlo da solo. In ogni caso, l'assenza di triptofano non può essere la base per spiegare la sua sensibilità al TNF α . Le possibili conseguenze patologiche di questa resistenza all'interferone non sono ancora chiare (58).

Questa resistenza ai fluorochinoloni è stata oggetto di studi. I fluorochinoloni inibiscono l'attività della DNA girasi. Quest'ultima contiene due subunità GyrA e due subunità GyrB. La resistenza ai chinoloni comunemente deriva da mutazioni a carico del gene che codifica

per le subunità GyrA della DNA girasi (*gyrA*). Più precisamente, le mutazioni in *gyrA* sono localizzate in una regione tra i nucleotidi 199 (Ala-67) e 318 (Gln-106), chiamata regione determinante la resistenza ai chinoloni (QRDR). Inoltre, anche *parC*, che è un gene omologo che codifica per la topoisomerasi IV, può essere mutato. Soprattutto mutazioni nella QRDR di *parC* possono avvenire e spiegare la resistenza ai chinoloni, sebbene meno frequentemente e in misura minore.

La sostituzione nella subunità GyrA della serina in posizione 83 con asparagina o isoleucina è stata associata con la resistenza delle *Chlamydiaeae* ai chinoloni. Per *S. negevensis*, la sostituzione in posizione 83 di una serina con un altro piccolo aminoacido idrofilico polare come la treonina non ha effetto sulla suscettibilità ai chinoloni. La resistenza osservata per *S. negevensis* alla ciprofloxacina è molto probabilmente dovuta a sostituzioni di altri aminoacidi presenti nella QRDR della GyrA. Infatti, in *S. negevensis* in posizione 99 è presente una glicina anche se tutti gli altri batteri hanno un'arginina. Tale sostituzione di un grosso aminoacido carico positivamente per uno piccolo e neutro potrebbe modificare la struttura tridimensionale della subunità A della DNA girasi.

Inoltre, la struttura terziaria della proteina può ulteriormente essere modificata dalla presenza di una cisteina in una posizione più vicina (101) nella DNA girasi di *S. negevensis*. In questa posizione tutte le specie delle *Chlamydiaeae* hanno una prolina, il cui anello potrebbe cambiare la geometria dello scheletro carbonioso (figura 11).

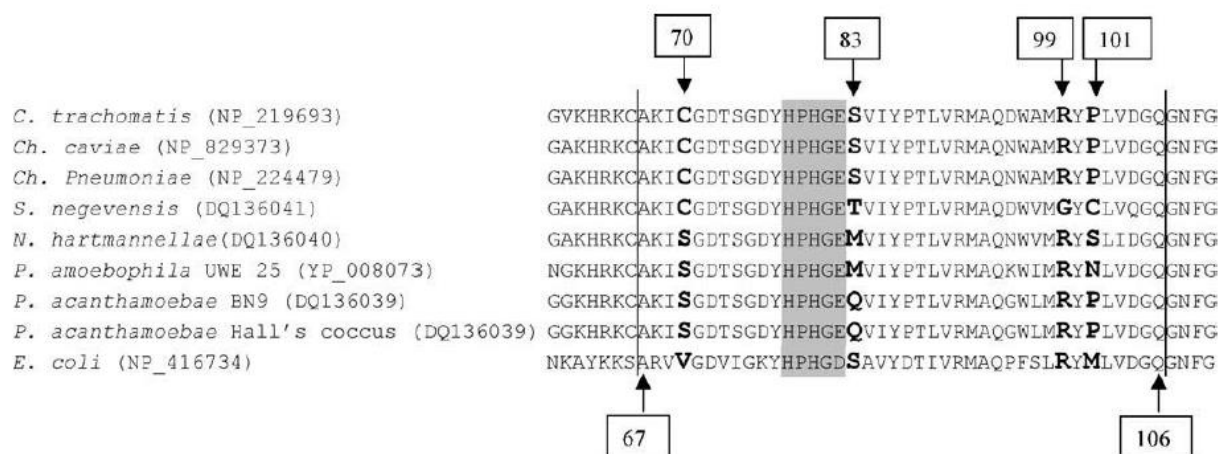


Figura 11. Confronto della sequenza amminoacidica di GyrA tra membri delle *Chlamydiaeae*

Nella QRDR di ParC di *S. negevensis* sono state osservate la sostituzione in posizione 81 di un'alanina con una treonina e la sostituzione in posizione 84 di un glutammato con una prolina. La sostituzione in posizione 81 di un piccolo aminoacido idrofobico (alanina) con

un aminoacido idrofilico polare (treonina) e la sostituzione in posizione 84 di un acido (glutammato) con un aminoacido non polare (prolina) potrebbero giocare un ruolo nella resistenza ai chinoloni osservata in *S. negevensis* (figura 12).

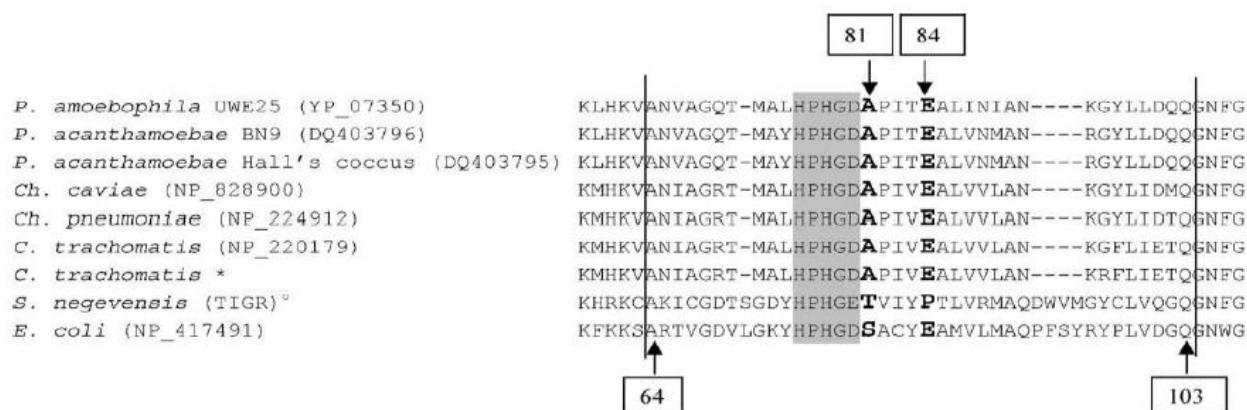


Figura 12. Confronto della sequenza amminoacidica di ParC tra membri delle *Chlamydiales*

Questa ipotesi è ulteriormente sostenuta dal fatto che in ParC, le sostituzioni aminoacidiche viste prima sono state trovate comunemente in ceppi di differenti specie batteriche resistenti ai chinoloni (59).

1.6 Sieroprevalenza

La sieroprevalenza di *S. negevensis* nella popolazione mostra importanti variazioni in diverse parti del mondo, dove si è vista un'alta percentuale come 55-80% in Israele, ma anche una bassa percentuale come 4% in Giappone.

Queste differenze possono essere in parte dovute alla sensibilità e specificità degli approcci sierologici utilizzati e al cut-off di positività stabilito (60). Il coinvolgimento di *S. negevensis* in infezioni del tratto respiratorio è stato studiato in diverse coorti di pazienti in Europa, nel medio Oriente e in America usando metodi diagnostici sierologici o molecolari (59) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (tabella 1).

Alcuni di questi studi riportano un'associazione tra *S. negevensis* e la polmonite acquisita in comunità (CAP), l'esacerbazione della pneumopatia cronica ostruttiva e (COPD) e bronchioliti in adulti e bambini (10) (61) (62) (65) (66) (67) (68).

Il ruolo di questo batterio come agente causale di CAP è, comunque, difficile da valutare e, proprio per questo, sono necessari ulteriori approfondimenti epidemiologici e sierologici per chiarire l'importanza di questo microrganismo a livello clinico.

L'incidenza di *S. negevensis* potrebbe essere più alta di quella osservata in alcune popolazioni o gruppi etnici, in presenza di concentrazioni del microrganismo non rilevabili dai metodi diagnostici utilizzati. È stata documentata un'alta sieroprevalenza di *S. negevensis*, in studi compiuti nel medio Oriente (nei Beduini) e nel nord del Canada (negli Inuit) (61) (63).

Uno studio svolto a Brooklyn (NY), al contrario, non ha evidenziato nessuna associazione di *S. negevensis* con problemi respiratori, malgrado l'alta prevalenza (23.5%) di anticorpi contro *S. negevensis* negli adulti e bambini di questa popolazione, ipotizzando che questi batteri simili a *Chlamydia* siano semplici colonizzatori (commensali). Pertanto, una valutazione approfondita del ruolo patogenetico di *S. negevensis* si rende necessaria (64).

Tabella 1. Riassunto degli studi effettuati (Lamoth et al. 2010 -Review-)

Population (country) and number of patients	Disease	Diagnostic method	Positive results	P value (if controls)	Recent infection* and no alternative pathogen	References
Adults (Israel) 308	CAP	Serology (IgG, IgA)	112 (37%)	No control	4 (1.3%)	Lieberman et al. (1997)
Infants (Israel) 239	Bronchiolitis	Culture and/or PCR (NP swabs)	60 (25%)	$P < 0.001$	38 (16%)	Kahane et al. (1998)
Adults (Israel) 190	COPD exacerbation	Serology (IgG, IgA)	120 (63%)	Not significant	1 (0.5%)	Lieberman et al. (2002)
Infants (Canada) 22	Bronchiolitis	PCR (NP swabs)	14 (64%)	No control	2 (9%)	Greenberg et al. (2003)
Adults/children (USA) 188	Bronchiolitis, Pneumonia	Serology (IgG) (n=69)	14 (18%)	Not significant	NA	Kumar et al. (2005)
	Asthma	PCR (NPI swabs) (n=169)	29 (17%)	Not significant	NA	
Adults (UK) 29	RTI	Serology (IgG)	18 (62%)	Not significant	NA	Friedman et al. (2006)
		Serology (IgA)	5 (17%)	$P=0.004$	NA	
Children (UK) 222	Bronchiolitis	Culture and/or PCR (NP swabs)	111 (50%)	No control	NA	Friedman et al. (2006)
Children (Italy) 101	CAP	Serology (IgM, IgG)	20–30%	No control	2 (2%)	Fasoli et al. (2008)
Children (Finland) 174	CAP	Serology (IgM)	18 (10%)	No control	6 (3.4%)	Heiskanen-Kosma et al. (2008)
Children (Brazil) 184	CAP	Serology (IgM, IgG)	3 (1.6%)	No control	1 (0.5%)	Nascimento-Carvalho et al. (2009)

È stato studiato anche l'eventuale coinvolgimento di *S. negevensis* in altri disturbi respiratori, come la tosse cronica o l'asma, ma i dati a questo riguardo sono ancora dubbi (64) (69).

In uno studio, *S. negevensis* è stata ricercata tramite il metodo molecolare della PCR in campioni di lavaggi broncoalveolari di pazienti sottoposti trapianto di polmone, mostrando

sorprendentemente un'elevata prevalenza di questo microorganismo pari al 97.5%, (rispetto al 14% evidenziato in pazienti sottoposti a trapianto di altri organi solidi) con una possibile associazione al rigetto acuto dell'organo. Infatti, il 59% dei pazienti positivi in PCR, per *S. negevensis*, in paragone al 30% di pazienti con rigetto ma risultati negativi alla PCR, per *S. negevensis* (70).

Un ulteriore studio sottolinea il fatto che pazienti ospedalizzati esposti a particelle di aerosol, come quelli in ventilazione meccanica, potrebbero così essere colonizzati o infettati da questo batterio intracellulare, il cui ruolo patogenetico in questo ambiente è stato studiato, al momento, ben poco (71).

Sono molto interessanti gli studi eseguiti *in vitro* per comprendere la patogenesi delle infezioni da *S. negevensis*: in questi studi è stata dimostrata l'abilità del microorganismo nell'infettare macrofagi umani e nell'indurre una risposta infiammatoria dell'ospite (9) (11).

Altri più recenti studi, eseguiti in Finlandia, hanno permesso l'analisi, mediante real-time PCR, su campioni prelevati da pazienti con sospette infezioni del tratto respiratorio. I risultati hanno però mostrato assenza di infezione da *S. negevensis* in questi pazienti (72).

In Italia, un recente studio del nostro gruppo di lavoro ha valutato la presenza di anticorpi IgG e IgA anti- *S. negevensis* in pazienti adulti con problemi respiratori e in pazienti sempre adulti con disturbi gastrointestinali. Per quanto riguarda i pazienti con problemi respiratori, le percentuali di positività sono in accordo con i dati riportati in letteratura, mostrando una positività per le IgG del 50% e per le IgA del 13%. In pazienti, invece, con problemi gastroenterici le percentuali rilevate di anticorpi sono addirittura maggiori evidenziando le IgG nel 68% e le IgA nel 18% dei pazienti studiati. La sieroprevalenza delle infezioni da *S. negevensis* in questi pazienti risulta, quindi, significativamente più alta rispetto ai controlli sani. Questi dati, in associazione con la evidenziazione riportata in alcuni lavori di *S. negevensis* in campioni di acqua, potrebbe suggerire un'infezione per via orale (73).

1.6.1 Età di acquisizione

Una stima dell'età di acquisizione dell'infezione da *S. negevensis* può essere ottenuta attraverso la determinazione della sieroprevalenza in differenti gruppi d'età. Questo tipo di studi è stato effettuato sull'intera popolazione kibbutz di Negev, in Israele.

È stata valutata la sieropositività nei confronti di *S. negevensis*, *C. pneumoniae* e *C. trachomatis*, evidenziando (figura 13) che l'infezione sia con *S. negevensis* che con *C. pneumoniae* veniva acquisita molto precocemente in questo tipo di popolazione.

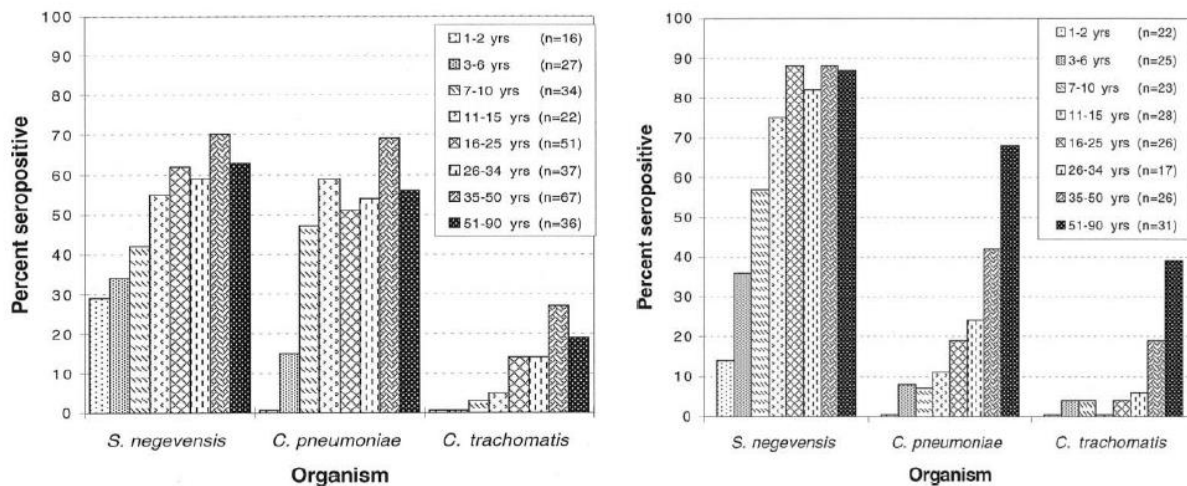


Figura 13. Sieroprevalenza in differenti gruppi d'età (sinistra) dell'intera popolazione kibbutz e (a destra) dei beduini sani.

Inoltre, è stata valutata la sieroprevalenza in campioni di Beduini sani di varie età. In entrambi i gruppi studiati, l'infezione da *S. negevensis* veniva acquisita in un'età molto precocemente; comunque, tra i Beduini, l'infezione da *C. pneumoniae* veniva acquisita molto più lentamente. I bambini kibbutz stanno più a stretto contatto con i loro coetanei dai primi anni di vita, mentre la maggior parte dei bambini Beduini vengono organizzati in attività di gruppo quando iniziano la scuola all'età di 6 anni. Il differente pattern di acquisizione dell'infezione evidenziato per i due microrganismi potrebbe riflettere le diverse modalità di trasmissione dell'infezione (10).

1.6.2 Patologie associate

Come detto in precedenza, sono state descritte numerose associazioni tra *S. negevensis* e problemi al tratto respiratorio. Il batterio è stato associato a bronchioliti in bambini tramite metodiche molecolari e sierologiche (61) (63).

È stata evidenziata una possibile associazione tra *S. negevensis* e le polmoniti acquisite in comunità e con l'esacerbazione acuta della pneumopatia cronica ostruttiva (AECOPD) in adulti, solo in base a studi sierologici (59) (62). Analogamente, è stata ipotizzata un'associazione tra l'infezione con *S. negevensis* e tosse persistente.

Le infezioni da *S. negevensis* potrebbero non essere limitate al solo tratto respiratorio, ma interessare anche altri organi e apparati (70) (73), considerando il fatto che una disseminazione sistemica del batterio tramite macrofagi infettati, potrebbe favorire il suo arrivo in organi target, con conseguenti complicanze patologiche (11).

Diagnosi di laboratorio

Chlamydia pneumoniae

Per anni il gold standard per la diagnosi sierologica delle infezioni da clamidie è stata la microimmunofluorescenza (MIF), tramite la quale veniva valutato il profilo sierologico del paziente, e l'ELISA o l'isolamento delle clamidie in cellule per la loro evidenziazione nei campioni clinici. Lo sviluppo delle tecniche molecolari ha permesso di ottenere l'ottimizzazione della tecnica di PCR per una più rapida e specifica diagnosi. Nella maggior parte dei laboratori le richieste per la ricerca di *C. pneumoniae* sono limitate, al contrario di quelle per *C. trachomatis*. Considerando quindi che le tecniche molecolari sono più costose, vengono eseguite prevalentemente per *C. trachomatis*; per le infezioni da *C. pneumoniae*, in alcuni casi si effettua la PCR, ma il metodo di diagnosi più frequente è rappresentato dalla ricerca di anticorpi anti-microrganismo, tramite metodi immunoenzimatici, tra questi la MIF o in alcuni laboratori il saggio ELISA con utilizzo di antigeni che coprono più specie di clamidie insieme, comuni alle varie specie, e solo in caso di positività si esegue la MIF specifica per ogni specie.

Simkania negevensis

Non sono ancora stati sviluppati dei test standardizzati per la diagnosi delle infezioni da *S. negevensis*, ma vengono utilizzati dei test "home-made". Questi sostanzialmente si possono basare su due metodi:

1. Metodo diretto mediante isolamento del microrganismo in colture cellulari e tecniche di biologia molecolare sul microrganismo isolato o direttamente sul campione clinico.
2. Metodo indiretto, o sierologico, che permette di ricercare gli anticorpi circolanti specifici, tramite tecniche immunoenzimatiche o di immunofluorescenza indiretta (IFI).

Nella ricerca di questo microrganismo è necessario considerare il suo parassitismo intracellulare obbligato, per cui il campione clinico deve contenere cellule infette e una quantità sufficiente di corpi elementari, soprattutto nel tentativo di isolamento tramite colture cellulari e nella ricerca diretta con tecniche molecolari. I campioni clinici devono essere posti in un mezzo di trasporto adeguato e rappresentato dal saccarosio fosfato. Inoltre,

i campioni clinici dovrebbero essere conservati a 4°C se utilizzati entro 24 ore, o congelati a -70°C (il congelamento potrebbe causare un calo dell'infettività).

2.1 Isolamento e identificazione in colture cellulari

Chlamydia pneumoniae

Si può dimostrare la presenza dei batteri in adeguati materiali patologici mediante isolamento *in vitro* in colture cellulari pretrattate per favorire l'infezione. Generalmente per la raccolta di cellule infette nel paziente viene eseguito un tampone faringeo, e conservato in adeguato terreno di trasporto. Questo tampone viene poi vortexato con delle biglie in vetro sterili, precedentemente inserite, in modo tale che le cellule all'interno si rompano ma le eventuali clamidie presenti non vengano danneggiate. Il campione viene poi raccolto e correttamente conservato in provette sterili. Parte del campione viene poi diluito e inoculato in un monostrato cellulare confluyente. Le linee cellulari utilizzate sono diverse, tra cui LLC-MK2, HeLa, McCoy e HL. Si devono rispettare svariate condizioni per permettere la crescita ottimale dei microrganismi, tra cui incubazione a 33-37°C al 5% di CO₂, utilizzo di appropriati terreni di crescita con pH intorno a 7, presenza di nutrienti e metaboliti specifici per le diverse specie oltre che antibiotici inibenti contaminazioni da parte di altri microbi. La centrifugazione a 3000 RPM a 33°C favorisce l'ingresso dei patogeni nelle cellule bersaglio e dunque l'infettività.

Terminato il periodo d'incubazione, che per la *C. pneumoniae* è di 3-4 giorni, sui monostrati cellulari infetti è possibile eseguire diverse colorazioni per valutare la presenza dell'agente patogeno. Prima di eseguire la colorazione è necessario fissare e rendere permeabile il monostrato mediante l'uso di metanolo per 5-10 minuti. La colorazione di Giemsa è applicabile a tutte le specie del genere *Chlamydia* ed evidenzia i costituenti basici fissanti l'eosina in rosso e i costituenti acidi leganti il Blu di Metilene in blu. Di più recente introduzione sono le colorazioni immunofluorescenti che impiegano anticorpi monoclonali coniugati a fluorescina per la rilevazione, attraverso lettura al microscopio ottico a fluorescenza, di antigeni specie-specifici quali la *MOMP* o gruppo-specifici quali il LPS. La fluorescenza emessa dagli anticorpi anti-LPS è meno intensa e definita rispetto a quella anti-*MOMP*. Questi tipi di colorazioni sono generalmente dirette o semi-dirette (figura 14). In un laboratorio attrezzato l'isolamento *in vitro*, seppur non applicabile di routine, risulta relativamente rapido e con una sensibilità superiore al 95%.

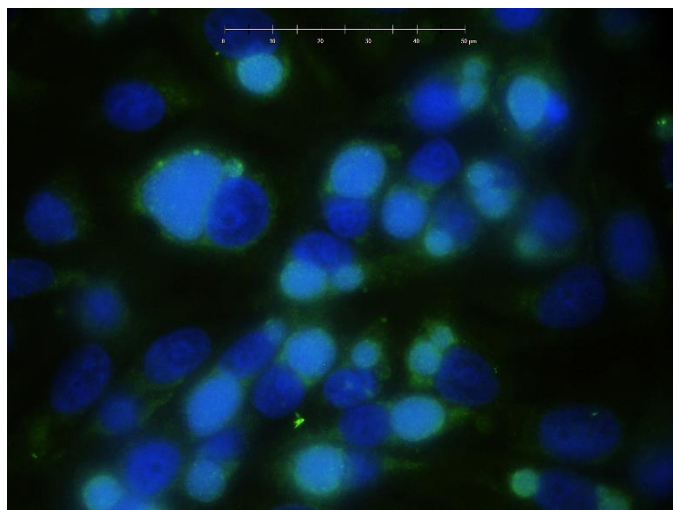


Figura 14. *C. pneumoniae* colorata mediante colorazione semi-diretta a 48h p.i.

Simkania negevensis

Per utilizzare questo metodo è necessario disporre di linee cellulari idonee. Considerando la similarità di *S. negevensis* con le clamidie, si è cercato di adeguare i protocolli già esistenti alla crescita di questo nuovo microrganismo. Inoltre, si possono utilizzare sia colture cellulari di mammifero che di amebe (74).

S. negevensis può crescere in varie linee cellulari (11). Le cellule Vero sono usate correntemente per isolare il microrganismo dai campioni clinici. Inoltre, è stato possibile coltivare il batterio in cellule Hep-2, HeLa, LLCMK2, e in cellule U937 (linea cellulare di macrofagi umani). Il terreno di prima scelta è l'RPMI contenente il 15% di siero bovino fetale (SBF), l'1% di glucosio, 100 unità di penicillina per ml, 100 µg di gentamicina per ml, 160 µg di vancomicina per ml e 1 µg di cicloeximide per ml (54). Si devono aggiungere antibiotici al terreno per inibire la crescita di altri batteri e di funghi, e la cicloeximide per inibire il metabolismo eucariotico, favorendo in questo modo il parassitismo energetico del microrganismo.

Sono state ricercate varianti a questo metodo, per esempio, pretrattando le cellule con sostanze particolari o anche sonicandole. La sonicazione dovrebbe favorire l'assorbimento sulle cellule ospiti di particelle infettanti ma, in realtà, non è risultata necessaria probabilmente per la fragilità dei corpi elementari (74) (75). La centrifugazione, al contrario, favorisce il contatto dei corpi elementari con le cellule ospiti, aumentando l'infettività (figura 15).

treatment	experiment no. (inclusions per 30 fields)			mean	P ³⁾
	1	2	3		
none	152	125	154	144	
sonication ¹⁾	141	151	138	143	0.982
centrifugation ²⁾	628	511	491	543	0.0102
both	651	564	517	577	0.00813

¹⁾: Inocula were sonicated at 20 kHz for 20 s with an ultrasonic liquid processor before being applied to host cells.

²⁾: After inoculation with *S. negevensis*, the culture plate was centrifuged at 1,500 × g for 60 min at 35°C.

³⁾: Statistical analysis was performed using Student's *t* test for paired samples, with *P* < 0.05 considered as significant.

Figura 15. Effetti della sonicazione e della centrifugazione sulla crescita

La variazione di concentrazione del SBF dal 15% al 10% non ha modificato il grado di infettività, dimostrando che un terreno ricco di nutrienti non è richiesto per la crescita di *S. negevensis*. Il pretrattamento delle cellule ospiti con PEG o DEAE-dextran migliora la crescita delle clamidie. L'elevato peso molecolare del PEG riduce la costante dielettrica e quindi aumenta l'idrofobicità della membrana cellulare, facilitando la fusione delle particelle infettanti con la membrana delle cellule ospiti.

medium no.	additional components of culture media			experiment no. (inclusions per 30 fields)			mean	P ³⁾
	FCS concentration (%)	antimicrobial agents ¹⁾	cycloheximide ²⁾	1	2	3		
control	10	No	No	651	564	517	577	
1	10	No	Yes	534	494	415	481	0.0201
2	10	Yes	Yes	482	509	373	455	0.0712
3	15	No	No	595	662	547	601	0.644
4	15	Yes	Yes	521	526	384	477	0.0845

¹⁾: The following antimicrobial agents added to the samples: 100 µg/ml of streptomycin and 100 µg/ml of vancomycin.

²⁾: Supplemented cycloheximide was 1.0 µg/ml.

³⁾: Statistical analysis was performed using Student's *t* test for paired samples, with *P* < 0.05 considered as significant.

Figura 16. Confronto fra i differenti terreni di coltura utilizzati per la crescita

Il trattamento con PEG al 7% è risultato tossico su cellule Vero, infettate con *S. negevensis*. Poiché sia la superficie delle cellule ospiti che quella delle inclusioni sono cariche negativamente, il pretrattamento con il policatione DEAE-destrano favorisce l'assorbimento delle clamidie alle cellule ospiti. Per quanto riguarda *S. negevensis*, invece, il pretrattamento con 30 µg/ml di DEAE-destrano riduce significativamente la sua infettività (figura 16) (75).

S. negevensis è stata fatta crescere anche in colture cellulari di amebe. Le specie di amebe "a vita libera" appartenenti al genere *Acanthamoeba* si sono mostrate ospiti naturali di diversi batteri resistenti alle amebe, inclusa *S. negevensis* (figura 17).

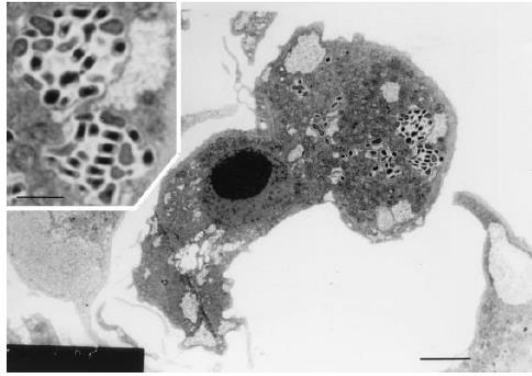


Figura 17. *A. polyphaga* infettata con *S. negevensis*.

Acanthamoeba polyphaga, trofozoite, può essere infettata con *S. negevensis* in molti modi: le amebe possono essere aggiunte a colture di cellule Vero infettate (co-coltura), oppure le particelle infettanti di *S. negevensis* cresciute in cellule Vero possono essere incubate con *A. polyphaga* in terreno di coltura specifico, il PYG (peptone, lievito, glucosio), o amebe infette possono essere diluite in terreno PYG con amebe non infette (8) (76). Oltre ad *A. polyphaga* come colture cellulari possono essere usate anche colture di *A. castellanii*.

Il ciclo di sviluppo delle amebe comprende due fasi distinte: il trofozoite (forma vegetativa) e la cisti (forma resistente) capace di sopravvivere in condizioni estreme. *S. negevensis* riesce a sopravvivere anche in cisti di amebe, infatti si possono individuare inclusioni di *S. negevensis* anche dopo settimane o mesi dall'infezione (8).

L'isolamento tramite colture cellulari risulta comunque molto dispendioso e indaginoso sia in termini di tempo che di materiali utilizzati: esso quindi viene generalmente usato per ricerca e non a fini diagnostici.

Per evidenziare la crescita di *S. negevensis* in colture cellulari (sia di amebe che di mammifero) sono necessarie delle colorazioni. Quelle più utilizzate sono: Giemsa, Gimenez, e IFI.

Nella colorazione di Giemsa, i batteri vengono colorati in blu e il resto della cellula assume un colore rosa-viola chiaro. Si può ottenere un risultato migliore utilizzando la colorazione leggermente modificata di Giemsa-May-Grünwald, dove si possono vedere le inclusioni blu nettamente distinto dal nucleo delle cellule che si colora in rosa con l'eosina.

Nella colorazione di Gimenez (figura 18), i batteri sono di colore rosa su uno sfondo verde, creando un contrasto molto più netto rispetto al Giemsa: tale colorazione risulta quindi più utile ai fini dell'individuazione del microrganismo.

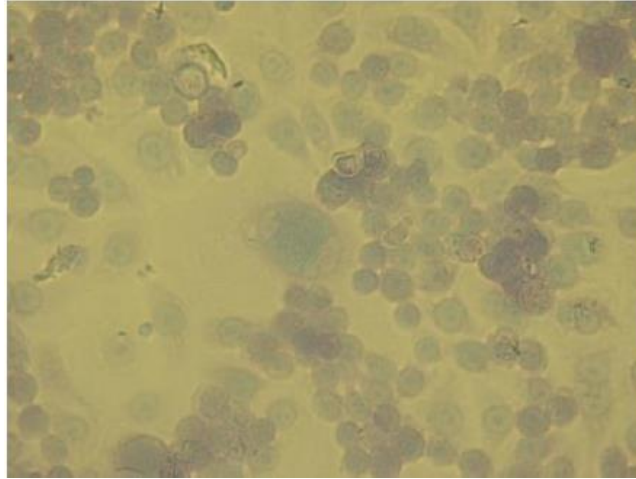


Figura 18. *S. negevensis* in cellule LLMCK2 colorate mediante Gimenez

L'immunofluorescenza rimane comunque la tecnica con maggior sensibilità e specificità, anche se la sua applicazione ai microrganismi simili a clamidie, come *S. negevensis*, è limitata dalla mancata disponibilità in commercio di anticorpi specifici.

Gli anticorpi anti-*Chlamydiaceae* reperibili in commercio non riconoscono le strutture di membrana di *S. negevensis*. È necessario quindi utilizzare degli anticorpi "home-made" specifici (74).

Sono stati prodotti sieri iperimmuni anti-*S. negevensis* nel coniglio, tramite un'iniezione intracutanea contenente una miscela di antigene di *S. negevensis* e l'adiuvante completo di Freund, e sette iniezioni intracutanee con antigene di *S. negevensis* e l'adiuvante incompleto di Freund. Gli intervalli tra le immunizzazioni sono comprese tra 7 e 14 giorni.

Nella reazione di IFI (figura 19), dopo aver fissato le cellule infette con il metanolo, esse vengono incubate con il siero policlonale iperimmune di coniglio contro *S. negevensis* per 1 ora a 37°C; successivamente, si fanno dei lavaggi con PBS, e si aggiungono anticorpi anti-immunoglobuline G di coniglio, coniugati con fluorescina. Infine, si osservano le inclusioni di *S. negevensis* con il microscopio a fluorescenza (75).

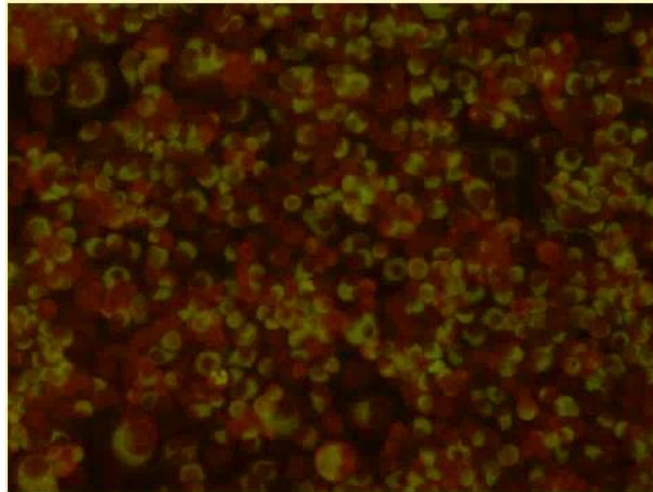


Figura 19. *S. negevensis* colorata mediante IFI

L'anticorpo monoclonale D5-14, prodotto nel nostro laboratorio contro *C. trachomatis* sierotipo LGV2, permette di visualizzare le inclusioni in cellule infettate con *S. negevensis* con il test di IFI (figura 20). Il D5-14 reagisce in immunoblot con una proteina di circa 64-66 kDa di *C. trachomatis* sierotipo LGV2, e riconosce una proteina con lo stesso peso molecolare quando testata con corpi elementari di *S. negevensis* (77).

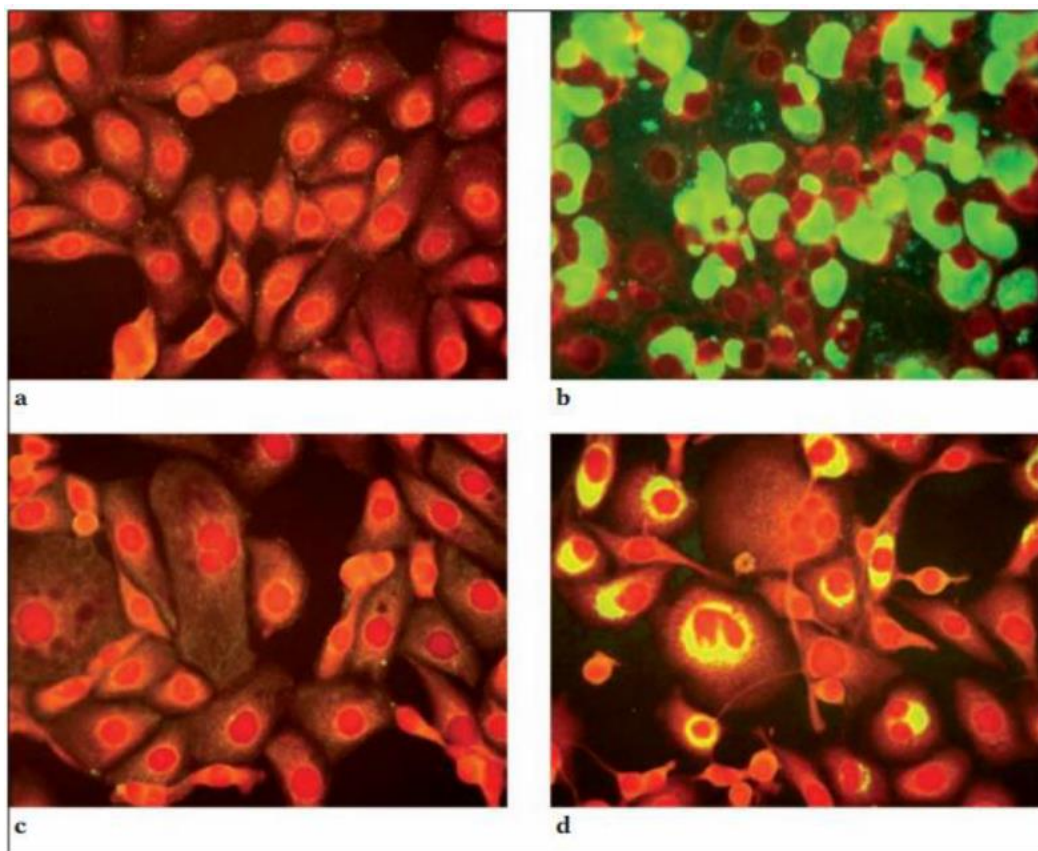


Figura 20. Inclusioni di *C. trachomatis* dopo 8 h (a) e 48 h (b) dall'infezione, evidenziate con anticorpo monoclonale D5-14; inclusioni di *S. negevensis* dopo 14 h (c) e 72 h (d) dall'infezione evidenziate con D5-14.

Pertanto, l'anticorpo monoclonale D5-14 potrebbe essere usato nella diagnosi di infezione da *S. negevensis*.

2.2 Tecniche di biologia molecolare

L'amplificazione degli acidi nucleici mediante PCR e tecniche correlate vengono usate largamente nei laboratori di microbiologia clinica per ricercare o identificare tutti quei microrganismi che possono essere presenti nei campioni clinici.

Queste tecniche molecolari sono specialmente utili in studi epidemiologici e come strumento diagnostico, per esempio, se è difficoltosa la crescita in coltura. In più, i metodi di PCR che valutano la presenza di geni filogeneticamente informativi, come il gene del 16 S rRNA, contribuiscono all'identificazione di nuovi ceppi e specie.

Di recente sono state sviluppate tecniche di PCR, per lo studio di nuove clamidie, che hanno come target soprattutto l'operone ribosomale. Comunque, anche altre sequenze di geni sono di valore diagnostico e filogenetico, come quelle del gene che codifica per la traslocasi ATP/ADP. L'identificazione delle specie e dei ceppi potrebbe essere attuata utilizzando primer specifici per tassonomia, o direttamente o come primer interni in una nested PCR, o sequenziando i prodotti della PCR. Per le nuove clamidie, il sequenziamento del gene del 16 S rRNA rimane il metodo ottimale per identificare i ceppi, dal momento che questo gene housekeeping porta con sé l'informazione filogenetica e sequenze di geni 16S rRNA che sono disponibili per i ceppi di ogni tipo.

Poiché *S. negevensis* è tra i pochi microrganismi a possedere un introne di gruppo I nel 23S rRNA, è stato disegnato un set di primers IntF/IntR specifico per il batterio in grado di amplificare un frammento di 338 bp dell'introne (50)(74).

Queste regioni presentano, però, una certa variabilità. Per questo è necessario individuare dei nuovi markers per l'identificazione di questi microrganismi. A tale proposito, è stato eseguito uno studio per verificare la presenza di inserzioni/delezioni specifiche per le clamidie in proteine essenziali. Le proteine più interessanti sono risultate: la subunità α dell'RNA polimerasi (RpoA), il fattore di elongazione (EF)-Tu, EF-P, la subunità B della DNA girasi (GyrB) e la lisil-tRNA sintetasi (LysRS), che sono caratteristiche distintive di tutte le omologie disponibili tra le clamidie (78).

Un ulteriore possibile marker per differenziare le diverse specie di clamidie è il gene RNasi P. L'endoribonucleasi P (RNasi P) è un complesso ribonucleoproteico che rimuove le sequenze a monte del 5' dai precursori dei tRNA durante la loro biosintesi. L'RNasi P è presente in tutte le cellule e organelli che sintetizzano tRNA, ma l'attività catalitica è stata osservata solamente nelle RNasi P batteriche. Il prodotto di PCR ottenuto dalle *Chlamydiaceae* presenta un'omologia compresa tra il 63,8 e il 69,3% rispetto al frammento ottenuto da *S. negevensis*. È quindi possibile utilizzare il gene RNasi P come marker per differenziare le diverse clamidie. Inoltre, è stata sviluppata una PCR specifica per *S. negevensis* avente come target il gene groEL codificante la proteina dello shock termico 60 (79).

2.3 Metodi immunoenzimatici

I metodi immunoenzimatici ci permettono di rilevare la presenza di anticorpi nei confronti del microrganismo d'interesse, direttamente nel siero del paziente. La tecnica più utilizzata è il saggio ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*): di questo metodo ci sono diverse varianti e non essendoci un metodo standard per *S. negevensis*, sono tutte "home-made". Una di queste versioni è stata messa a punto da Kahane et al., e si è rivelata avere un'ottima correlazione con la microimmunofluorescenza, considerata come il gold standard della sierologia per le clamidie. Il saggio è stato ovviamente adattato per la ricerca di anticorpi contro *S. negevensis*, sostituendo i corpi elementari purificati delle clamidie con quelli di *S. negevensis*. Questa tecnica è risultata altamente specifica, con riduzione della cross-reattività degli epitopi del LPS degli antigeni, previo trattamento con deoxicolato e un lavaggio con urea 6M che rilascia anticorpi con bassa affinità (80). Anche per *C. pneumoniae* è possibile utilizzare il saggio ELISA, e generalmente come detto in precedenza i kit in commercio prevedono l'uso di antigeni comuni a più specie di clamidie per ridurre i costi.

2.4 Microimmunofluorescenza

Il test sierologico gold standard per le clamidie è la microimmunofluorescenza (MIF). Non esiste ancora un test standard di immunofluorescenza per la diagnosi di infezione da *S. negevensis*. È stato quindi valutata la capacità di questa metodica nel ricercare gli anticorpi

diretti nei confronti di *S. negevensis*. Anche qui, come per il metodo ELISA, sono state apportate modifiche a protocolli già presenti in letteratura.

I corpi elementari di *S. negevensis* vengono diluiti in PBS e una microgoccia di tale sospensione viene adagiata in ciascun pozzetto di un vetrino. Successivamente, i vetrini sono stati asciugati all'aria per 60 minuti, fissati in acetone per 30 minuti a temperatura ambiente, nuovamente asciugati e poi conservati a -80°C fino al momento dell'uso.

Vengono testate diluizioni seriali al raddoppio dei sieri, iniziando dalla diluizione 1:8 e i vetrini posti in un contenitore umido, vengono incubati per 60 minuti a 37°C. Dopo vari lavaggi con PBS e acqua distillata i corpi elementari presenti nei vetrini, vengono nuovamente incubati con un siero anti-IgG umane coniugate con fluorescina. Infine, in seguito a ripetuti lavaggi, i vetrini vengono asciugati, montati e osservati al microscopio a fluorescenza (figura 21). Il titolo viene definito come l'inverso della diluizione del siero più alta che presenta ancora una chiara positività (51).

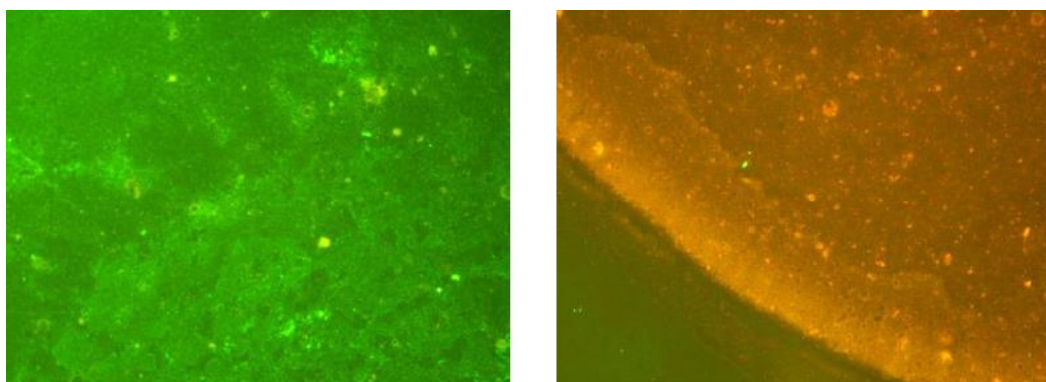


Figura 21. Immagine MIF: a sinistra campione positivo per *S. negevensis*; a destra campione negativo

Scopo del lavoro

C. pneumoniae e *S. negevensis* sono due batteri Gram-negativi, parassiti intracellulari obbligati, entrambi appartenenti all'ordine *Chlamydiales*.

C.pneumoniae è stata isolata per la prima volta come TW-183 a Taiwan nel 1965, e successivamente come AR-39 nel 1983 a Seattle. Da quel momento in poi sono stati svolti numerosi studi per comprendere in quali patologie era coinvolta, utilizzando sia metodi sierologici, molecolari che isolamento con colture cellulari. Il ruolo di questa clamidia è stato confermato principalmente in patologie respiratorie come le polmoniti da comunità o asma; numerosi ricercatori non si sono, però, limitati allo studio di queste patologie; sono infatti stati svolti studi su patologie a tendenza cronica, prima fra tutti l'aterosclerosi, perché il microrganismo è capace di infettare monociti e macrofagi eludendo il sistema immunitario dell'ospite. Inoltre, questo microrganismo ha dimostrato capacità di infettare anche cellule endoteliali e cellule muscolari lisce, le quali sono coinvolte nella patogenesi dell'aterosclerosi.

S. negevensis, al contrario, è di recente scoperta. È stata descritta per la prima volta nel 1999 e isolata in Israele. Questo microrganismo è stato però poco studiato e i diversi gruppi di ricerca hanno opinioni contrastanti sull'argomento poiché si ha l'idea che possa essere un semplice commensale delle basse vie aeree e non un vero agente patogeno. In base ad alcuni studi sieroepidemiologici la prevalenza delle infezioni da *S. negevensis* è abbastanza elevata in Israele, nel Nord America e in Europa occidentale, ma bassa in Giappone e ciò può essere in parte dovuto a differenze nelle metodologie impiegate o nei valori di cut-off stabiliti per valutare la positività all'infezione. Questo microrganismo condivide però delle caratteristiche biologiche molto importanti con *C. pneumoniae*, come la capacità di infettare i macrofagi e utilizzarli come veicolo di disseminazione all'interno dell'organismo. Inoltre, è stata dimostrata la capacità di infettare cellule endoteliali vascolari, nelle quali può instaurare anche infezioni di tipo persistente, come visto in passato per *C. pneumoniae*.

Lo scopo della presente tesi è stato quello di indagare la sieroprevalenza dell'infezione da *S. negevensis* e *C. pneumoniae* in pazienti in attesa di intervento di rimozione della placca a livello dell'arteria carotidea. Inoltre, avendo a disposizione il tessuto rimosso è stato possibile valutare anche la presenza del DNA di entrambi i microrganismi all'interno delle cellule che compongono il tessuto patologico. Al fine di valutare un possibile coinvolgimento non solo di *C.*

pneumoniae come visto in passato, ma anche di *S. negevensis* visto e considerato che non sono presenti dati in letteratura a questo riguardo.

Materiali e metodi

Il lavoro presentato in questa tesi ha ottenuto parere favorevole da parte del Comitato Etico Indipendente dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi in data 12/05/2015. Prot. SN-01-02. Riferimento n° 65/2015/U/Tess.

Nel periodo tra Maggio e Ottobre 2015 sono stati arruolati 50 pazienti, con età media di 76 anni e in lista per l'intervento di endoarteriectomia carotidea (CEA). Il protocollo dello studio prevedeva la raccolta di un campione di sangue, circa 5 ml, e della placca rimossa dopo intervento di CEA.

Il campione di sangue è stato centrifugato mediante centrifugazione per 5 minuti a 3000 rpm ed il siero è stato poi raccolto e conservato in provette sterile a -20°C fino all'utilizzo.

Le placche carotidee raccolte in provette con fisiologica in sala operatoria sono poi state conservate a -80°C fino all'attuazione delle procedure di estrazione e amplificazione del DNA.

Coltivazione di *S. negevensis* e *C. pneumoniae*

Il ceppo di riferimento ZT di *S. negevensis* (ATCC VR-1471) e il ceppo di riferimento IOL-207 di *C. pneumoniae* sono stati fatti crescere in cellule LLC-MK2 (linea continua proveniente da rene di scimmia), coltivate in fiasche sterili in presenza di terreno, Eagle MEM (Minimal Essential Medium).

Per la coltura delle cellule sono state aggiunte una serie di sostanze al terreno, quali siero bovino fetale (SBF), glucosio, L-glutammina e, inoltre, antibiotici e antimicotici (per evitare la crescita di altri batteri e/o funghi) come vancomicina, gentamicina e fungizone (inattivi nei confronti dei due microrganismi).

Per favorire la crescita di *S. negevensis* e *C. pneumoniae* al terreno di crescita, contenenti concentrazioni maggiori di farmaci, glucosio e SBF rispetto al terreno per colture cellulari, è stata aggiunta la cicloeximide che, rallentando il metabolismo cellulare, fa aumentare l'infettività dei corpi elementari (75). Le concentrazioni delle diverse sostanze aggiunte ai terreni è indicata in tabella 2.

Tabella 2. Concentrazioni e quantità delle diverse sostanze aggiunte ai terreni di coltura.

	Terreno Eagle MEM per cellule (ogni 500 ml)	Terreno Eagle MEM per <i>C. pneumoniae</i> (ogni 500 ml)	Terreno RPMI per <i>S.</i> <i>negevensis</i> (ogni 500ml)
SBF (inattivato a 56°C per 30 minuti)	50 ml	100 ml	75 ml
L-glutammina (200mM)	50 ml	100 ml	75 ml
Glucosio	6 ml (5,94 gr/100 ml H2O)	2 gr	4 g
Fungizone	0,15 (µg/ml)	1 ml (1 µg/ml)	1 ml (2 µg/ml)
Vancomicina	0,5 ml (10µg/ml)	5 ml (10µg/ml)	8 ml (160 µg/ml)
Gentamicina	0,125 ml (40µg/ml)	0,6 ml (40µg/ml)	1,2 ml (100 µg/ml)
Cicloeximide (1µg/ml)	/	0,7 ml	0,7 ml

Per *S. negevensis* è stato utilizzato il terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e per *C. pneumoniae* il terreno Eagle MEM (Minimal Essential Medium).

Le fiasche, contenenti le sospensioni cellulari, sono state poste ad incubare per 48-72 ore in termostato a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Dopo la formazione del monostrato, le cellule sono state staccate dalla fiasca con tripsina-EDTA e risospese e nuovamente in terreno di crescita, in modo da ottenere una concentrazione di 10⁵ cellule/ml. La sospensione cellulare è stata ripartita in provette di plastica con tappo a vite, contenenti sul fondo un vetrino di 1 cm di diametro, nella quantità di 1 ml di sospensione cellulare/provetta. Le provette sono state messe nuovamente in incubatore in modo da ottenere 100.000 cellule/vetrino dopo circa 24 ore di incubazione. Il giorno successivo, le provette sono state infettate con *S. negevensis* e *C. pneumoniae*. Prima di infettare il monostrato cellulare è stato rimosso il terreno di crescita delle cellule e sostituito con 1 ml di sospensione di *S. negevensis* o *C. pneumoniae*. Per favorire l'infezione, e l'ingresso dei microrganismi all'interno delle cellule, le provette sono state centrifugate per 3 ore a 3000 rpm, alla temperatura di 33°C e

successivamente poste a incubare in termostato a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Data la durata diversa del ciclo di sviluppo di *C. pneumoniae* e *S. negevensis*, i monostrati infettati con *C. pneumoniae* sono stati fatti incubare per 3 giorni mentre quelli infettati con per *S. negevensis* per 5 giorni. Per verificare il grado d'infettività è stata effettuata una colorazione di immunofluorescenza diretta nel caso di *C. pneumoniae* e indiretta per *S. negevensis*. Per effettuare la colorazione, è stato rimosso il terreno di accrescimento all'interno delle provette e sostituito da metanolo, che è stato lasciato agire per 5 minuti in modo da permettere il fissaggio delle cellule.

Per la colorazione diretta di *C. pneumoniae*, il monostrato è stato messo a contatto con anticorpi monoclonali diretti contro l'LPS delle clamidie, coniugati a fluorescina, e messo ad incubare per 30 minuti in vaschetta umida a 37°C. Terminata l'incubazione, è stato effettuato un lavaggio veloce in H₂O distillata e i vetrini sono stati montati con glicerina.

Per la colorazione di *S. negevensis*, invece, il monostrato, sempre dopo fissaggio con metanolo, è stato messo a contatto con l'anticorpo monoclonale D5-14 prodotto nel nostro laboratorio e reattivo nei confronti di una proteina di superficie di 64-66 kDa di *S. negevensis*. Dopo una incubazione per 40 minuti in vaschetta umida a 37°C, sono stati effettuati lavaggi con H₂O e PBS, e successivamente è stato aggiunto l'anticorpo secondario anti-immunoglobuline di topo diluito 1/30 coniugato con fluorescina. All'incubazione per 30 minuti in vaschetta umida a 37°C, sono seguiti ulteriori lavaggi ed infine al monostrato è stato aggiunto blu di Evans per un minuto in modo tale da smorzare la fluorescenza di fondo e i vetrini sono stati montati con glicerina.

A questo punto è stato possibile controllare al microscopio a fluorescenza l'infettività, nei monostrati cellulari, di *S. negevensis* e *C. pneumoniae*, osservando il numero di inclusioni citoplasmatiche verdi fluorescenti presenti rispetto ai nuclei cellulari e alle cellule non infette colorate di rosso. La valutazione del grado di infettività (numero di inclusioni presenti) permette di calcolare la diluizione adeguata di *S. negevensis* o *C. pneumoniae* in modo tale da ottenere, nel passaggio successivo in nuove cellule, il 100% d'infettività.

A questo punto, per ottenere grandi quantitativi di cellule infettate con *S. negevensis* o *C. pneumoniae*, le provette con i monostrati infetti sono state agitate per almeno 1 minuto su vortex (in modo da staccare il monostrato dal vetrino) e la sospensione con le cellule infettate, adeguatamente diluita con il terreno idoneo a seconda del microrganismo, è stata inoculata in 30 piastre a 6 pozzetti a fondo piano (figura 22) contenente monostrati cellulari,

nella quantità di 4 ml/pozzetto. Le piastre sono state poi messe a centrifugare a 2000 rpm per 2 ore a 33°C e successivamente lasciate in termostato per 3 o 5 giorni per permettere la crescita di *C. pneumoniae* o *S. negevensis* rispettivamente.

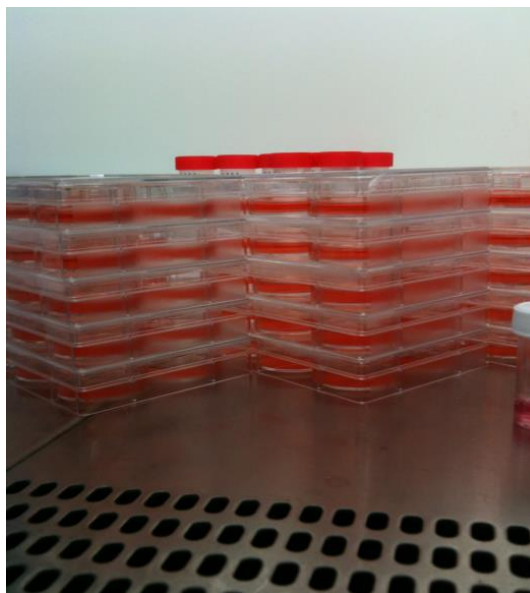


Figura 22. Piastre a 6 pozzetti

Purificazione dei corpi elementari di *S. negevensis* e *C. pneumoniae*

I corpi elementari (CE) di *S. negevensis* e *C. pneumoniae* sono stati purificati in gradiente di saccarosio seguendo la procedura di Fukushi e Hirai, con opportune modifiche (81). Dopo 3 o 5 giorni dall'infezione, il monostrato cellulare infettato è stato staccato dalle piastre mediante rubber sterile e raccolto in provette da 50 ml, e tenute in ghiaccio. La sospensione è stata sonicata a bassa intensità per 3 volte per 15 secondi, in modo tale da rompere le membrane cellulari e liberare i microrganismi e poi centrifugata a 3000 rpm per 10 minuti a 4°C. Recuperato il sovrnatante, questo è stato ripartito in provette da ultracentrifuga e centrifugato a 18000 rpm per 35 minuti a 4°C, con accelerazione e decelerazione massima.

Una volta ottenuto il pellet, eliminando il sovrnatante, esso è stato risospeso in 40 ml totali di Tris Buffer (0,01 M, pH 7,4), sonicato 2 volte per 15 secondi e stratificato sopra un cuscino di 8 ml di saccarosio al 30% in Tris Buffer, quindi ultracentrifugato a 18000 rpm per 40 minuti a 4°C, con accelerazione e decelerazione minima. Dopo la centrifugazione il pellet è stato risospeso in 2 ml di Tris Buffer, sonicato 1 volta per 10 secondi e posizionato delicatamente sul gradiente di saccarosio 30-60% in Tris. Il gradiente è stato ottenuto in

precedenza facendo scorrere lentamente, con una pompa peristaltica, 14 ml della soluzione di saccarosio al 60% in TRIS e 14 ml di quella al 30% in una provetta da ultracentrifuga. La successiva centrifugazione è stata effettuata a 18000 rpm per 50 minuti a 4°C, con accelerazione e decelerazione minima.

La banda dei CE (figura 23) è stata poi raccolta con una siringa, e risospesa in circa 30 ml di Tris quindi centrifugata a 18000 rpm per 35 minuti a 4°C, con accelerazione e decelerazione massima. I CE presenti nel pellet sono stati risospesi in 250-300 µl di Tris Buffer, sonicati 1 volta per 10 secondi, ripartiti in piccole aliquote di 10 µl ciascuna e conservati a -70°C fino al momento dell'uso.

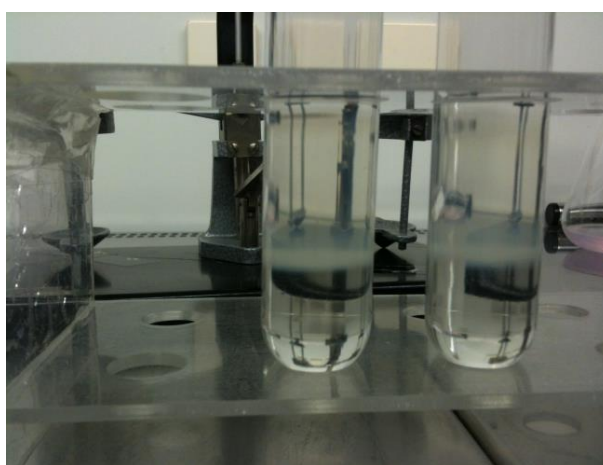


Figura 23. Banda dei CE in gradiente di saccarosio 30-60%

Metodica immunoenzimatica ‘home-made’

La metodica immunoenzimatica da noi utilizzata era quella messa a punto in precedenza per la ricerca di anticorpi contro *C. psittaci* (82). La concentrazione proteica dei CE è stata determinata con il Kit Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Richmond, CA) con albumina sierica bovina come standard. I CE di *S. negevensis* o *C. pneumoniae*, precedentemente purificati, sono stati diluiti, in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 µg/ml, in Coating Buffer PBS con 0.03M Sodio Carbonato e 0.068M Sodio Bicarbonato, pH 9.4-9.8) e dispensati nella quantità di 100 µl/pozzetto in una micropiastra a 96 pozzetti (figura 24).

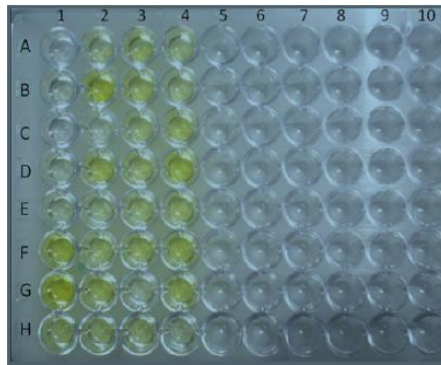


Figura 24. Piastra a 96 pozzetti in cui è stata effettuata la tecnica ELISA

La piastra è stata tenuta overnight in vaschetta umida a 4°C. Il giorno successivo, la piastra è stata capovolta per svuotare i pozzetti e sono stati aggiunti in ogni pozzetto 200 µl di soluzione bloccante di latte al 5% in PBS-Tween-EDTA. Dopo incubazione per 1 ora a temperatura ambiente, sono stati effettuati 5 lavaggi nell'arco di 10 min con 200 µl di PBS-Tween-EDTA/pozzetto. Successivamente, sono stati dispensati 200 µl di latte all'1% in PBS-Tween-EDTA a cui sono stati aggiunti 2 µl di siero dei pazienti da esaminare in modo tale da ottenere una diluizione di ciascun siero di 1/100 sia per la ricerca delle IgG che delle IgA anti-*S. negevensis* o *C. pneumoniae*.

La piastra è stata successivamente lasciata in incubazione per 1 ora a 37°C, e poi nuovamente lavata come descritto in precedenza. A questo punto, sono stati aggiunti 100 µl di un siero policlonale anti-IgG o IgA umane (prodotto nel coniglio) coniugato con perossidasi e diluito 1/500 in PBS-Tween-EDTA in ogni pozzetto della piastra. Dopo incubazione per 1 ora a 37°C, sono stati effettuati ulteriori lavaggi e infine dispensati nei pozzetti 100 µl di tetrametilbenzidina (substrato specifico per l'enzima). La reazione è stata infine bloccata dopo circa 10 minuti aggiungendo ai pozzetti 100 µl di stop solution. L'assorbanza relativa ai campioni esaminati è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda (λ) di 450 nm contro i 620 nm di riferimento. Un campione di siero era definito come positivo quando presentava un valore in densità ottiche di almeno due deviazioni standard sopra la media di 20 campioni negativi. Inoltre, due sieri di controllo positivi al test di MIF per *S. negevensis* e due per *C. pneumoniae* sono stati inseriti in ciascuna seduta sperimentale ELISA. Ogni saggio è stato effettuato in triplicato.

Estrazione del DNA dai tessuti

Una volta ottenuto il tessuto patologico è stato preparato il piano di lavoro sterile sotto una cappa a flusso laminare, PBS, mortaio e sabbia sterilizzata in precedenza. Il campione è stato inserito all'interno del mortaio e, con l'aggiunta di un po' di sabbia, frizionato e frantumato fino ad ottenere un composto omogeneo. Il composto è stato poi trasferito in una provetta sterile e centrifugato per 10 minuti a 4°C a 1500 rpm. Dopo la centrifugazione, il surnatante viene utilizzato per l'estrazione del DNA.

L'estrazione del DNA è stata eseguita utilizzando il kit Qiagen per estrazione di DNA da cellule (QIAamp DNA Mini kit). Parte del surnatante (100 µl) è stato risospeso in 180 µl di Buffer ATL e 20 µl di Proteinasi K, e vortexato per 5 secondi a 15 Hz. Ogni campione viene poi incubato a 56°C per 1 ora a 600 rpm in un termoblocco. Alla fine dell'incubazione vengono aggiunti 200 µl di Buffer AL e 200 µl di etanolo (96-100%). Il campione viene poi trasferito in una specifica colonnina del kit (figura 25) e centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm in una mini ultracentrifuga. Finita la centrifugazione, lo scarto rimane sulla parte finale della colonnina, che può essere rimossa e sostituita da una nuova. Vengono aggiunti 500 µl di Buffer AW1 e centrifugato per 1 minuto a 8000 rpm, come è stato fatto al passaggio precedente, la parte di sotto della colonnina contenente lo scarto viene rimossa e sostituita. Vengono aggiunti 500 µl di Buffer AW2 e centrifugato per 3 minuti a 14000 rpm e la parte con lo scarto rimossa. A questo punto, anziché inserire una parte nuova, viene inserita una eppendorf da 1,5 ml con il tappo tagliato, in modo tale da avere un fondo più stretto. Vengono aggiunti 100 µl di Buffer AE e lasciati in contatto con il filtro all'interno della colonnina per 1 minuto. Finito il minuto, viene centrifugato per 2 minuti a 14000 rpm. Tutti i campioni vengono poi trasferiti in eppendorf con il tappo e conservato a -20°C fino al saggio di PCR.



Figura 25. Colonnina contenente un filtro centrale per l'estrazione di DNA da cellule

Amplificazione del DNA

Per l'amplificazione del DNA si è preferito utilizzare la nested-PCR, questa metodica è costituita da due amplificazioni sequenziali, dalla prima amplificazione si ottiene un frammento di dimensioni maggiori che viene poi utilizzato per la seconda amplificazione che mediante l'uso di primer interni al primo frammento, si ottiene un frammento di dimensioni minori ma altamente specifico.

Primer

Chlamydia pneumoniae

I primer utilizzati per allestire la nested-PCR di *C. pneumoniae* amplificano un frammento del gene *Pst1*. I primer esterni (CP1, CP2) amplificano un frammento di 404 bp, i primer interni (CPN1, CPN2) un frammento di 214 bp (83).

CP1: 5'-TTATTCACCGTCCTACAGCAGAAA-3'

CP2: 5'-GGGGGTTTCAGGGATCATTGT-3'

CPN1: 5'-TTACGAAACGGCATTACAACGGCTAGAAATCAAT-3'

CPN2: 5'-TATGGCATATCCGCTTCGGGAACGAT-3'

Simkania negevensis

I primer utilizzati per allestire la nested-PCR di *S. negevensis* amplificano un frammento del gene *cpn60*. I primer esterni (SN1, SN2) amplificano un frammento di 311 bp, i primer interni (SN3, SN4) un frammento di 153 bp (84).

SN1: 5'-GATGGAACGATGACTGTTGAA-3'

SN2: 5'-GCACAAACTTTTAGTCCTGC-3'

SN3: 5'-ATGCTTTCGTTCTGGTCTAC-3'

SN4: 5'-GGAGACGGTTGACAACAAGA-3'

Master Mix 1^a reazione

Per la prima reazione di amplificazione è stata preparata una master mix di 45 µl per ogni campione; tale master mix è stata suddivisa nel seguente modo:

- Acqua sterile 26,75 µl
- Buffer 5 µl
- Q solution 10 µl
- dNTPs 1 µl
- Primer 1F 1 µl
- Primer 1R 1 µl
- Taq polimerasi 0,25 µl

A questi 45 µl sono stati poi aggiunti 5 µl di DNA estratti in precedenza.

Master Mix 2^a reazione

Per la seconda reazione di amplificazione è stata preparata una seconda master mix di 49 µl per ogni campione; tale master mix è stata suddivisa nel seguente modo:

- Acqua sterile 30,75 µl
- Buffer 5 µl
- Q solution 10 µl
- dNTPs 1 µl
- Primer 1F 1 µl
- Primer 1R 1 µl
- Taq polimerasi 0,25 µl

A questi 49 µl è stato poi aggiunto 1 µl di amplificato ottenuto dalla prima reazione.

PCR

Ciò che varia di più per i microrganismi sono i cicli per l'amplificazione. Il DNA di *C. pneumoniae* è stato amplificato nella prima reazione per 40 cicli con una iniziale denaturazione di 3 minuti a 95°C e un'estensione finale di 5 minuti a 72°C. Il programma ciclico consiste in 30 secondi di denaturazione a 95°C, 45 secondi di annealing a 60°C e 30 secondi di estensione a 72°C. Le condizioni della seconda reazione rimangono identiche, eccetto per il numero di cicli che diventano 35.

Il DNA di *S. negevensis* è stato amplificato nella prima reazione per 35 cicli con una iniziale denaturazione di 4 minuti a 94°C e un'estensione finale di 7 minuti a 72°C. Il programma ciclico consiste in 1 minuto di denaturazione a 94°C, 1 minuto di annealing a 55°C e 1 minuto di estensione a 72°C. Le condizioni della seconda reazione invece prevedono 25 cicli con un iniziale denaturazione di 4 minuti a 94°C e un'estensione finale di 5 minuti a 72°C. Il programma ciclico è più breve della prima reazione e consiste in 30 secondi di denaturazione a 94°C, 30 secondi di annealing a 56°C, e 30 secondi di estensione a 72°C.

Elettroforesi

I prodotti della PCR vengono poi caricati su un gel di agarosio al 2% e fatti correre a 100 V, 400 A, per circa un'ora con un marker adeguato (100 bp DNA ladder, Qiagen), che ci permette di determinare il corretto posizionamento di ogni banda (figura 26). Vengono poi evidenziate mediante transilluminatore.

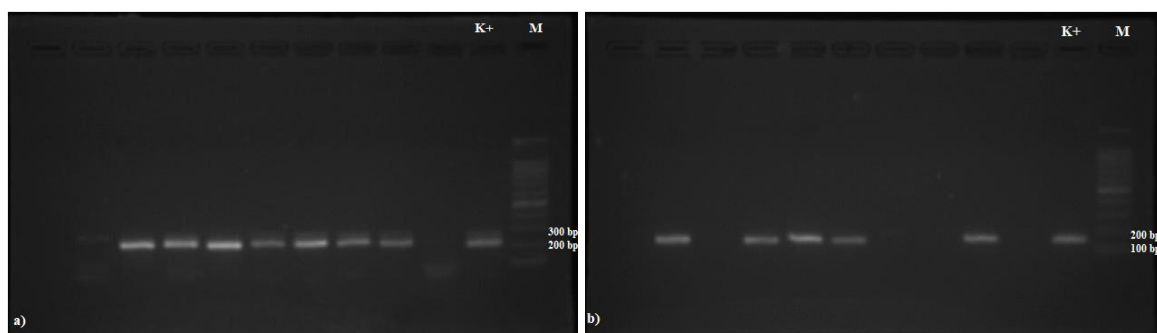


Figura 26. Elettroforesi di: a) campioni positivi a *C. pneumoniae* con le bande posizionate tra la 200 bp e la 300 bp del marker; b) campioni positivi a *S. negevensis* con le bande posizionate tra la 100 bp e la 200 bp del marker.

Risultati

I sieri sono stati testati in triplicato per avere una maggiore attendibilità dei risultati ottenuti e testati sia per *S. negevensis* che per *C. pneumoniae*,

Lo scopo principale è stato quello di valutare la presenza di un'infezione non di tipo primario con elevata presenza di IgM, IgG ritardate e bassi livelli di IgA, ma di tipo secondario attiva dove si ha un'assenza di IgM ma elevati titoli di IgG e IgA. Per questo studio ci è sembrato opportuno valutare la presenza delle sole IgG e IgA perché si tratta di pazienti che non sono stati ricoverati per problemi respiratori, quindi più probabilmente sono entrati in contatto con i microrganismi in precedenza.

I risultati sierologici ottenuti sono presentati in tabella 3.

Tabella 3. Risultati sierologici

ELISA	IgG +	IgA +
<i>S. negevensis</i>	14	5
<i>C. pneumoniae</i>	10	4

Sono state evidenziate IgG anti-*S. negevensis* nel 28% e IgA nel 10% dei 50 sieri esaminati. IgG e IgA nei confronti di *C. pneumoniae* sono state ritrovate nel 20% e nell'8%, rispettivamente, dei sieri testati.

Questi dati sierologici risultano molto interessanti, soprattutto per quanto concerne *S. negevensis*. Le percentuali di sieri positivi sia per IgG (quasi del 30%) che per le IgA (10%) sono notevolmente superiori alle percentuali di positività riscontrate, secondo i dati di letteratura, in soggetti sani.

La maggior parte dei sieri positivi per le IgA anti-*S. negevensis* non ha presentato IgA anti-*C. pneumoniae*, fatta eccezione per due campioni. Per comprendere se si trattava di una cross-reattività o di una co-infezione è stato eseguito un test di neutralizzazione, che ha confermato la presenza di co-infezione. In alcuni dei sieri con IgG anti-*S. negevensis* sono state evidenziate IgG anche nei confronti di *C. pneumoniae* ma a titolo più basso.

Questo scenario fa ipotizzare che non solo i due microrganismi possano dare co-infezione ma anche una possibile riattivazione nel tempo, dopo aver instaurato un'infezione cronica.

I risultati molecolari sono presentati in tabella 4.

Tabella 4. Risultati amplificazione del DNA

PCR	<i>S. negevensis</i>	<i>C. pneumoniae</i>
Positivi	17	13
Negativi	33	39

Questi dati indicano una percentuale di positività in PCR del 34% per *S. negevensis*, e del 26% per *C. pneumoniae*.

Dato che in bibliografia non ci sono lavori analoghi con dati in PCR sulla presenza di *S. negevensis* in questo gruppo di pazienti, non ci è stato possibile confrontare i nostri risultati. Per quanto riguarda *C. pneumoniae*, invece, le nostre percentuali di positività in PCR corrispondono a quelle presenti in bibliografia (83). Questi dati confermano ancora una volta come questo microrganismo possa essere presente in patologie che tendono a cronicizzarsi e avvalorano quindi l'ipotesi che un'infezione da parte di questo microrganismo possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo delle stesse.

Discussione

L'aterosclerosi è una patologia che nel corso degli anni ha suscitato molto interesse, sia per l'elevata incidenza e la gravità delle conseguenze che la patologia in stadio avanzato comporta, sia perché non è ancora del tutto nota la sua eziologia.

L'ipotesi del coinvolgimento di un'infezione come fattore di rischio o addirittura l'evento scatenante è sempre stato un argomento controverso a causa dell'assenza di dati certi e univoci. Nonostante ciò, sono stati effettuati numerosi studi soprattutto per valutare il coinvolgimento di *C. pneumoniae*, in quanto questo microrganismo ha delle caratteristiche biologiche che potrebbero spiegare lo sviluppo della patologia. La caratteristica più interessante è sicuramente quella di eludere il sistema immunitario dell'ospite ed essere trasportato nel circolo da monociti o macrofagi infettati dal tratto respiratorio a una superficie endoteliale distante e contribuire alla sua disfunzionalità. Questa infezione può essere riscontrata inoltre anche in cellule endoteliali e cellule muscolari lisce del tessuto vascolare mostrando un'induzione della produzione di proteine pro-infiammatorie e pro-coagulanti, tutti attori coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi.

Negli ultimi anni sono stati scoperti nuovi microrganismi dell'ordine *Chlamydiales*, uno di questi, *S. negevensis*, ha numerose caratteristiche in comune con *C. pneumoniae*, prima fra tutte la capacità di infettare macrofagi e usarli come veicolo di disseminazione. Questo microrganismo è stato studiato principalmente per patologie delle basse vie aeree, ma studi recenti stanno valutando il ruolo di questo microrganismo in patologie di altro genere. Grazie a questi studi è stato dimostrato che è capace di infettare anche cellule endoteliali vascolari, nelle quali può instaurare un'infezione di tipo cronico. Il ruolo di questo microrganismo non è però stato ancora valutato nell'aterosclerosi, probabilmente per l'assenza di kit commerciali utili a fini diagnostici.

Il metodo immunoenzimatico *home-made* utilizzato in questo studio, ha permesso di valutare, in pazienti sottoposti a endoarteriectomia carotidea, non solo la presenza di anticorpi anti-*C. pneumoniae* ma anche di anticorpi anti-*S. negevensis*, con percentuali uguali o superiori al 20% per le immunoglobuline di tipo G per entrambi i microrganismi e intorno al 10% per le immunoglobuline di tipo A. Per *S. negevensis* queste percentuali di positività sierologiche sono molto superiori rispetto a quelle riscontrabili in donatori sani.

Questi dati sono stati avvalorati successivamente dai risultati da noi ottenuti mediante tecniche molecolari, dove è stata evidenziata una positività del 34% per *S. negevensis*, e del 26% per *C. pneumoniae*. È di notevole interesse sottolineare come le percentuali riscontrate con tecniche molecolari risultino superiori alle percentuali di positività sierologica per le IgG dirette nei confronti dei due microrganismi, avvalorando l'ipotesi che questi batteri possano instaurare, all'interno dell'organismo, una forma persistente di infezione che potrebbe essere accompagnata da evidente risposta anticorpale, e quindi rilevabile mediante ricerca del DNA all'interno del tessuto.

Purtroppo questi dati, in associazione ai fattori di rischio riscontrati nei diversi pazienti, non ci permettono di individuare questo tipo di infezioni come possibili cause della formazione di lesioni aterosclerotiche. Questo però non toglie che esse possano essere considerate dei fattori adiuvanti la crescita nel tempo della lesione, mediante cronicizzazione dell'infezione stessa.

L'infezione da *C. pneumoniae* in questo studio, ancora una volta, dimostra di essere presente in patologie aterosclerotiche e con percentuali abbastanza costanti nei diversi studi. Come detto in precedenza i dati ottenuti invece per *S. negevensis* non sono confrontabili a dati presenti in letteratura vista l'assenza di studi in questa categoria di pazienti, o in generale in pazienti con aterosclerosi. Per questo motivo, sarebbe interessante approfondire il ruolo di questo microrganismo nell'eziopatogenesi di patologie croniche come l'aterosclerosi.

Bibliografia

1. **Stary, Herbert C.** *Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions: An Update.* [a cura di] *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000. p. 1177-1178. Vol. 20.
2. **Kumar, Vinay, Abbas, Abul K. e Fausto, Nelson.** Le basi patologiche delle malattie. 2006, Vol. 2, p. 516-522.
3. *Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction.* **Saikku, P., et al.** 1988, *Lancet.*, Vol. 2, p. 983-6.
4. *Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis – what we know and what we don't.* **J., Ngeh, V., Anand e S., Gupta.** 2002, *Clin Microbiol Infect*, Vol. 8, p. 2-13.
5. *Induction of macrophage foam cell formation by Chlamydia pneumoniae.* **M.V., Kalayoglu e G.I., Byrne.** 1998, *J Infect Dis*, Vol. 177, p. 725-9.
6. *Interaction of Chlamydiae with human macrophages.* **J-A, Herweg e T., Rudel.** 2015, *FEBS Journal*, Vol. 283, p. 608-18.
7. *Chlamydia pneumoniae antigens cause experimental aortic dilatation: an effect counteracted by azithromycin.* **J., Tambiah e J.T., Powell.** 2002, *Br J Surg*, Vol. 8, p. 2-13.
8. *Infection of Acanthamoeba polyphaga with Simkania negevensis and S. negevensis survival within amoebal cysts.* **S., Kahane, et al.** 2001, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 67, p. 4789-95.
9. *The role of monocyte/macrophages as vehicles of dissemination of Simkania negevensis: an in vitro simulation model.* **S., Kahane, B., Dvoskin e M.G., Friedman.** 2008, *FEMS Immunol Med Microbiol*, Vol. 52, p. 219-27.
10. *Infections with the Chlamydia-like microorganism Simkania negevensis, a possible emerging pathogen.* **M.G., Friedman, B., Dvoskin e S., Kahane.** 2003, *Microbes Infect*, Vol. 5, p. 1013-21.
11. *Versatility of Simkania negevensis infection in vitro and induction of host cell inflammatory cytokine response.* **S., Kahane, et al.** 2007, *Journal of Infection*, Vol. 55, p. e13-e21.
12. *Simkania negevensis and acute cellular rejection in lung transplant recipients.* **A.J., Jamal, et al.** 2015, *Clin Transplant*, Vol. 29, p. 705-11.
13. *Seroprevalence of a "new" bacterium, Simkania negevensis, in renal transplant recipients and in hemodialysis patients.* **A., Angeletti, et al.** 2017, *BMC Nephrol*, Vol. 18, p. 133.
14. *TWAR: a new chlamydial species?* **R., Nicosia, et al.** 1990, *Boll Ist Sieroter Milan*, Vol. 69, p. 441-5.
15. **La Placa.** *Principi di Microbiologia Medica.* Undicesima edizione, 38, p. 365-70.

16. *Inclusion proteins of Chlamydiaceae*. **Y., Pannekoek e A., van der Ende**. Drugs Today : s.n., 2006, Vol. 42, p. 65-73.
17. *Chlamydia persistence – a tool to dissect chlamydia-host interactions*. **Schoborg, R. V.** 2011, Microbes Infect., Vol. 13, p. 649-62.
18. *Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm*. **R.J., Hogan e al., et.** 2004, Infect. Immun., Vol. 72, p. 1843-55.
19. *Genome sequences of Chlamydia trachomatis MoPn and Chlamydia pneumoniae AR39*. **T.D., Read e al., et.** 2000, Nucleic Acids Res., Vol. 28, p. 1397-1406.
20. *Comparative genomes of Chlamydia pneumoniae and C. trachomatis*. **S., Kalman e al, et.** 1999, Vol. 21, p. 385-9.
21. *Genome Sequence of the obligate intracellular animal pathogen Chlamydia pecorum E58*. **S., Mojica e al., et.** 2011, J. Bacteriol., Vol. 193, p. 3690-7.
22. *Molecular basis defining human Chlamydia trachomatis tissue tropism – a possible role for tryptophan synthase*. **C., Fehlner-Gardiner e al., et.** 2002, J. Biol. Chem., Vol. 277, p. 26893-903.
23. *Divergent modulation of Chlamydia pneumoniae infection cycle in human monocytic and endothelial cells by iron, tryptophan availability and interferon gamma*. **R., Bellmann-Weiler e al., et.** 2010, Immunobiology, Vol. 215, p. 842-48.
24. *Chlamydia pneumoniae encodes a functional aromatic amino acid hydroxylase*. **S., Abromaitis e al., et.** 2009, FEMS Immunol. Med. Microbiol., Vol. 55, p. 196-205.
25. *Evidence that human Chlamydia pneumoniae was zoonotically acquired*. **G.S.A., Myers e al., et.** 2009, J. Bacteriol., Vol. 191, p. 7225-33.
26. *Comparison of koala LPCoLN and human strains of Chlamydia pneumoniae highlights extended genetic diversity in the species*. **C.M., Mitchell e al., et.** 2010, BMC Genomics, Vol. 11, p. 442-450.
27. *Role of disulphide bonding in outer-membrane structure and permeability in Chlamydia trachomatis*. **P., Bavoil e al., et.** 1984, Infect. Immun., Vol. 44, p. 479-85.
28. *Polymorphic proteins of Chlamydia spp. – autotransporters beyond the Proteobacteria*. **I.R., Henderson e A.C., Lam.** 2001, Trends Microbiol., Vol. 9, p. 573-8.
29. *From the inside out – processing of the chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells*. **W., Wehrl e al., et.** 2004, Mol. Microbiol., Vol. 51, p. 319-34.
30. *Unity in variety- the pan-genome of the Chlamydiae*. **A., Collingro e al., et.** 2011, Mol. Biol. Evol., Vol. 28, p. 3253-70.
31. *Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events*. **U., Gophna e al., et.** 2003, Gene, Vol. 312, p. 151-63.
32. *Type III secretion: more systems than you think*. **P., Troisfontaines e G.R., Cornelis.** 2005, Physiology, Vol. 20, p. 326-39.

33. *Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial type III secretion system.* **D.S.A., Beeckman e D.C.G., Vanrompay.** 2010, Curr. Issues Mol. Biol., Vol. 12, p. 17-41.
34. *Evolution and conservation of predicted inclusion membrane proteins in Chlamydiae.* **E.I., Lutter e al., et.** 2012, Comp. Funct. Genomics, Vol. 2012, p. 362104.
35. *Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment.* **H.A., Saka e R.H., Valdivia.** 2010, Curr. Opin. Microbiol., Vol. 13, p. 4-10.
36. *The transcriptional landscape of Chlamydia pneumoniae.* **M., Albrecht e et al.** 2011, Genome Biol., Vol. 12, p. 98-105.
37. *Differential expression of chlamydial signal transduction genes in normal and interferon gamma-induced persistent Chlamydophila pneumoniae infections.* **A., Polkinghorne e al, et.** 2006, Microbes Infect., Vol. 75, p. 61-72.
38. *The transcript profile of persistent Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae in vitro depends on the means by which persistence is induced.* **A., Klos e al., et.** 2009, Vol. 291, p. 120-6.
39. *Differential transcriptional responses between the interferon-gamma-induction and iron-limitation models of persistence for Chlamydia pneumoniae.* **P., Timms e al., et.** 2009, Vol. 42, p. 27-37.
40. *Gene expression profiles of Chlamydophila pneumoniae during the developmental cycle and iron depletion-mediated persistence.* **A.P., Maurer e al., et.** 2007, Vol. 3, p. 752-769.
41. *Divergent modulation of Chlamydia pneumoniae infection cycle in human monocytic and endothelial cells by iron, tryptophan availability and interferon gamma.* **R., Bellmann-Weiler e et al.** 2010, Immunobiology, Vol. 215, p. 842-8.
42. *Chlamydia pneumoniae: modern insights into an ancient pathogen.* **E., Roulis, A., Polkinghorne e P., Timms.** 2013, Trends in Microb., Vol. 21, p. 120-128.
43. *Community-acquired pneumonia related to intracellular pathogens.* **C., Cillóniz, et al.** 2016, Intensive Care Med, Vol. 42, p. 1374-86.
44. *Association of Chlamydia pneumoniae serology and ischemic stroke.* **Z.N., Hasan.** 2011, South. Med. J., Vol. 104, p. 319-21.
45. *Chlamydophila pneumoniae infection leads to smooth muscle cell proliferation and thickening in the coronary artery without contributions from a host immune response.* **Deniset, J.F. e et al.** 2010, Vol. 176, p. 1028-37.
46. *Initial characterization of Chlamydophila (Chlamydia) pneumoniae cultured from the late-onset Alzheimer brain.* **Dreses-Werringloer, U. e et al.** 2009, Int. J. Med. Microbiol., Vol. 299, p. 187-201.
47. *The evolving story of Chlamydia-induced reactive arthritis.* **J.D., Carter e A.P., Hudson.** 2010, Curr. Opin. Rheumatol., Vol. 22, p. 424-30.
48. *Chlamydia pneumoniae infection and lung cancer risk: a meta-analysis.* **P., Zhan e et al.** 2011, Eur. J. Cancer, Vol. 47, p. 742-7.

49. *Acute Chlamydia pneumoniae reinfection accelerates the development of insulin resistance and diabetes in obese C57BL/6 Mice.* **Wang, C.M. e et al.** 2009, J. Infect. Dis., Vol. 200, p. 279-87.
50. *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.* **K.D., Everett, R.M., Bush e A.A., Andersen.** 1999, Int J Syst Bacteriol, Vol. 49, p. 415-40.
51. *Prevalence of antibodies against Simkania negevensis in a healthy Japanese population determined by the microimmunofluorescence test.* **T., Yamaguchi, et al.** 2005, FEMS Immunol Med Microbiol, Vol. 43, p. 21-7.
52. *The growth cycle of Simkania negevensis.* **Microbiology.** **S., Kahane, N., Kimmel e M.G., Friedman.** 2002, Microbiology, Vol. 8, p. 735-42.
53. *Parachlamydiaceae: potential emerging pathogens.* **G., Greub e D., Raoult.** 2002, Emerg Infect Dis., Vol. 8, p. 625-30.
54. *Simkania negevensis strain ZT: growth, antigenic and genome characteristics.* **S., Kahane, et al.** 1999, Int J Syst Bacteriol, Vol. 49, p. 815-20.
55. *Nucleotide Parasitism by Simkania negevensis (Chlamydiae).* **S., Knab, et al.** 2011, J Bacteriol, Vol. 193, p. 225-35.
56. *Active self-splicing group I introns in 23S rRNA genes of hyperthermophilic bacteria, derived from introns in eukaryotic organelles.* **C.L., Nesbø e W.F., Doolittle.** 2003, Proc Natl Acad Sci U S A, Vol. 100, p. 14511.
57. *An unspliced group I intron in 23S rRNA links Chlamydiales, chloroplasts, and mitochondria.* **K.D., Everett, et al.** 1999, J Bacteriol, Vol. 181, p. 4734-40.
58. *Resistance of different Chlamydia-like organisms to quinolones and mutations in the quinoline resistance-determining region of the DNA gyrase A and topoisomerase-encoding genes.* **N., Casson e G., Greub.** 2006, Int J Antimicrob Agents, Vol. 27, p. 541-4.
59. *Pneumonia with serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like microorganism 'Z'.* **D., Lieberman, et al.** 1997, Am J Resp Crit Care Med, Vol. 156, p. 578-82.
60. *Amoebal pathogens as emerging causal agents of pneumonia.* **F., Lamoth, G., Greub e .** 2010, FEMS Microbiol Rev, Vol. 34, p. 260-80.
61. *High prevalence of 'Simkania Z,' a novel Chlamydia-like bacterium, in infants with acute bronchiolitis.* **S., Kahane, et al.** 1998, J Infect Dis, Vol. 177, p. 1425-9.
62. *Serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like microorganism Simkania negevensis (Z) in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease.* **D., Lieberman, et al.** 2002, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, Vol. 21, p. 307-9.
63. *High rate of Simkania negevensis among Canadian inuit infants hospitalized with lower respiratory tract infections.* **D., Greenberg, et al.** 2003, Scand J Infect Dis, p. 506-8.

64. *Infection with Simkania negevensis in Brooklyn, New York.* **S., Kumar, et al.** 2005, *Pediatr Infect Dis J*, Vol. 24, p. 989-92.
65. *Detection of Simkania negevensis by culture, PCR, and serology in respiratory tract infection in Cornwall, UK.* **M.G., Friedman, et al.** 2006, *J Clin Pathol*, Vol. 59, p. 331-3.
66. *Simkania negevensis in community-acquired pneumonia in Italian children.* **L., Fasoli, et al.** 2008, *Scand J Infect Dis*, Vol. 83, p. 269-72.
67. *Simkania negevensis may be a true cause of community acquired pneumonia in children.* **T., Heiskanen-Kosma, M., Paldanius e M., Korppi.** 2008, *Scand J Infect Dis*, Vol. 40, p. 127-30.
68. *Simkania negevensis infection among Brazilian children hospitalized with community-acquired pneumonia.* **C.M., Nascimento-Carvalho, et al.** 2009, *J Infect*, Vol. 58, p. 250-3.
69. *Simkania negevensis and newly diagnosed asthma: a case-control study in 1- to 6-year-old children.* **M., Korppi, et al.** 2006, *Respirology*, Vol. 11, p. 80-3.
70. *Simkania negevensis in bronchoalveolar lavage of lung transplant recipients: a possible association with acute rejection.* **S., Husain, et al.** 2007, *Transplantation*, Vol. 83, p. 138-43.
71. *Patients in intensive care unit are exposed to amoeba-associated pathogens.* **B., La Scola, et al.** 2002, *Infect Control Hosp Epidemiol*, Vol. 23, p. 462-5.
72. *Chlamydia-related bacteria in respiratory samples in Finland.* **S., Niemi, G., Greub e M., Puolakkainen.** 2011, *Microbes and Infection*, Vol. 13, p. 824-7.
73. *IgG and IgA response to Simkania negevensis in sera of patients with respiratory and gastrointestinal symptoms.* **M., Donati, et al.** 2013, *New Microbiologica*, Vol. 36, p. 303-6.
74. *Pathogenic potential of novel Chlamydiae and diagnostic approaches to infections due to these obligate intracellular bacteria.* **D., Corsaro e G., Greub.** 2006, *Clin Microbiol Rev*, Vol. 19, p. 283-97.
75. *Factors improving the propagation of Simkania negevensis strain Z in cell culture.* **T., Yamaguchi, et al.** 2004, *Jpn J Infect Dis*, Vol. 57, p. 103-6.
76. *Evidence for the presence of Simkania negevensis in drinking water and in reclaimed wastewater in Israel.* **S., Kahane, et al.** 2004, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 70, p. 3346-51.
77. *Detection of Simkania negevensis in cell culture by using a monoclonal antibody.* **M., Donati, et al.** 2013, *New Microbiologica*, Vol. 36, p. 85-88.
78. *Conserved indels in essential proteins that are distinctive characteristics of Chlamydiales and provide novel means for their identification.* **E., Griffiths, A.K., Petrich e R.S., Gupta.** 2005, *Microbiology*, Vol. 151, p. 2647-57.
79. *Characterization of the rnpB gene and RNase P RNA in the order Chlamydiales.* **B., Herrmann, et al.** 2000, *Int J Syst Evol Microbiol*, Vol. 50, p. 149-58.
80. *Seroprevalence of IgG antibodies to the Chlamydia-like microorganism 'Simkania Z' by ELISA.* **M.G., Friedman, et al.** 1999, *Epidemiol Infect*, Vol. 122, p. 117-23.

81. *Immunochemical diversity of the major outer membrane protein of avian and mammalian Chlamydia psittaci.* **H., Fukushi e K.J., Hirai.** 1988, J. Clin Microbiol, Vol. 26, p. 675-80.
82. *Serological response to pgp3 protein in animal and human chlamydial infections.* **M., Donati, et al.** 2009, Veterinary Microbiology, Vol. 135, p. 181-5.
83. *Association of Chlamydia pneumoniae Infection With Atherosclerotic Plaque Formation.* **O., Assar, et al.** 2015, Vol. 8, p. 260-7.
84. *Prevalence of Simkania negevensis in chlorinated water from spa swimming pools and domestic supplies.* **M., Donati, et al.** 2015, J Appl Microbiol, Vol. 118, p. 1076-82.