

Applicazioni di biologia molecolare nella diagnostica di *Bacillus anthracis* e altri batteri

Nella diagnostica microbiologica l'identificazione definitiva di isolati batterici avviene generalmente tramite l'esecuzione di test di caratterizzazione biochimica o antigenica che richiedono la crescita e la manipolazione di sospensioni batteriche. Come è intuibile, nel caso di agenti altamente patogeni, quest'approccio diagnostico può creare problemi di sicurezza per gli operatori e per l'ambiente nel quale essi operano. Un approccio basato su tecniche di biologia molecolare costituisce in questo caso una validissima alternativa, sia perché le analisi possono essere effettuate su campioni inattivati o direttamente su DNA estratto, sia perché i risultati portano all'identificazione certa del microrganismo responsabile. Sono di seguito riportate alcune metodiche molecolari messe a punto per l'identificazione di *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis*, utili per la conferma definitiva di stipiti batterici eventualmente isolati dai laboratori di microbiologia di 1° livello.

PROCEDURE DI IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE

Estrazione e purificazione del DNA da colonia batterica

Per motivi di sicurezza degli operatori, tutte le procedure tecniche di estrazione e purificazione del DNA

batterico devono essere eseguite in un laboratorio di biosicurezza P3, sotto una cappa biologica Biohazard. Il DNA viene estratto direttamente da patina batterica cresciuta su una piastra di agar sangue a 37 °C, mediante l'impiego di kit commerciali. Sono stati sviluppati protocolli di estrazione diversi per *F. tularensis*, *Y. pestis* e *B. anthracis*. Infatti, le cellule di *B. anthracis* necessitano di un pretrattamento con lisostafina, per la digestione della spessa parete batterica.

Sono state messe a punto metodiche molecolari per l'identificazione di batteri altamente patogeni

PCR identificativa per *B. anthracis*

La ricerca di metodi molecolari rapidi atti all'individuazione della presenza di tracce di *B. anthracis* si è concentrata principalmente su due tipi di bersaglio molecolare: il gene della subunità b dell'RNA polimerasi, localizzato sul cromosoma del batterio, e i geni di virulenza localizzati sui due

Le metodiche molecolari per l'individuazione di *Bacillus anthracis* prevedono rapidità nell'esecuzione del test

plasmidi pXO1 e pXO2 presenti nei ceppi virulenti del batterio. Per il riconoscimento del plasmide pXO1 sono stati descritti oligonucleotidi specifici per uno dei componenti della tossina (gene pag), del fattore edematoso (gene cya) o del fattore letale (gene lef), mentre la presenza del plasmide pXO2 viene ricercata mediante una coppia di oligonucleotidi disegnati su uno dei geni che codificano per le proteine della capsula del batterio (geni cap B, C, A) (1).

Le tecniche di rilevazione di *B. anthracis*, basate sull'amplificazione per PCR dei geni rpoB, cap e pag (2, 3), sono state riprodotte dal gruppo di studio per il bioterrorismo del Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

La Figura 1a mostra il risultato delle PCR sul gene rpoB condotte sui DNA di *B. anthracis* (corsia 2), *Bacillus cereus* (corsia 3), *Bacillus subtilis* (corsia 4), *Escherichia coli* (corsia 5) e su DNA estratto da cellule umane (corsia 6). Sebbene il gene della subunità b dell'RNA polimerasi mostri un livello di omologia superiore al 98%

Alessandra Carattoli¹, Alessandra Ciervo¹, Gianni Pozzi² e Marco Oggioni²

¹Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, ISS

²Dipartimento di Biologia Molecolare, Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Università degli Studi di Siena, Siena

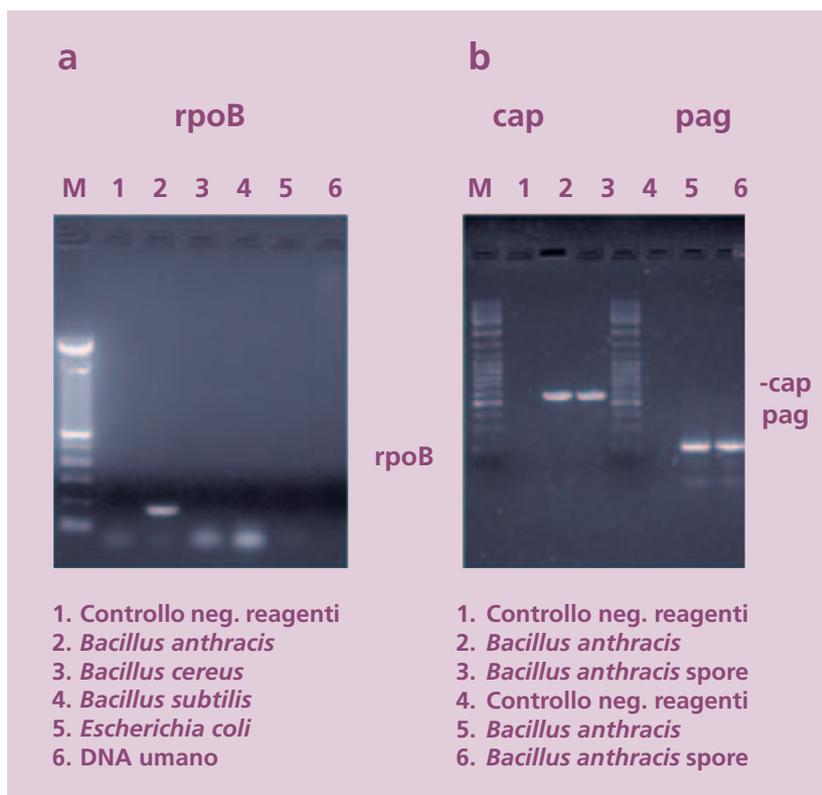


Figura 1 - Identificazione di *Bacillus anthracis* mediante amplificazione di geni specifici

per i ceppi di specie diverse appartenenti al genere *Bacillus*, questa coppia di *primer*, in determinate condizioni, riesce a riconoscere specificatamente solo il gene di *B. anthracis* e non amplifica quello degli altri bacilli, né quello di altri batteri o dell'uomo. Questa tecnica si è dimostrata alquanto difficile da applicare in quanto necessita di condizioni di PCR particolari, quali l'aggiunta della Taq polimerasi dopo un lungo ciclo di riscaldamento (*hot start*). In altre condizioni sono state osservate reazioni di positività con il *B. cereus* e per questo motivo la metodologia può essere considerata poco affidabile e deve essere affiancata da ulteriori prove molecolari di conferma come le PCR condotte per i geni *cap* e *pag* mostrate in Figura 1b. Questa Figura mostra il risultato delle PCR sul DNA estratto di *B. anthracis* (corsie 2 e 5, rispettivamente) e su spore non trattate di *B. anthracis* CarboSap (corsie 3 e 6, rispettivamente). Il ceppo *B. anthracis* CarboSap è un vaccino vivo atte-

nuato prodotto per uso veterinario, che possiede entrambi i plasmidi di virulenza del ceppo patogeno (4).

I prodotti di PCR osservati sono del peso molecolare di 572-bp per il gene *cap* e di 210-bp per il gene *pag* e risultano essere specifici per l'individuazione dei due plasmidi pXO1 e pXO2 di *B. anthracis*.

Identificazione di *B. anthracis* mediante un saggio di real-time PCR

La necessità di individuare metodi identificativi di altissima specificità e sensibilità è di primaria importanza nel caso di uso deliberato a scopo bioterroristico di spore di *B. anthracis*. Tra le tecniche disponibili la più innovativa è senz'altro quella basata sulla tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy

Transfer) applicata alla PCR in tempo reale (real-time PCR). Questa tecnica permette di amplificare un frammento di DNA e contemporaneamente di ibridarlo con sonde specifiche, analizzando la cinetica di dissociazione dell'ibrido in funzione della temperatura. La procedura consiste nell'utilizzazione di due sonde oligonucleotidiche che mappano sullo stesso frammento di PCR a distanza di pochi nucleotidi l'una dall'altra: una sonda viene marcata con una fluoresceina al 3' che emette a lunghezza d'onda di 520 nm, mentre l'altra è marcata al 5' con un fluorocromo che emette nel rosso a 640 nm (LC Red 640). Il tracciante LC Red 640 emette la fluorescenza solo se eccitato dall'emissione della fluoresceina. La specificità dell'ibridazione è garantita dal fatto che l'emissione di fluorescenza rossa avviene solo quando entrambe le sonde ibridano sullo stesso frammento di DNA amplificato. Se il frammento amplificato ha una sequenza nucleotidica con una o più mutazioni puntiformi rispetto a quella della sonda, la temperatura di dissociazione (T_m) dell'ibrido sarà più bassa che nel caso di sequenze perfettamente identiche. Si possono ottenere delle curve di dissociazione dell'ibrido monitorando la fluorescenza in funzione della temperatura.

Questa tecnica è stata applicata al riconoscimento di *B. anthracis* utilizzando due sonde

in grado di riconoscere il gene *rpoB* di *B. anthracis* da quello di qualunque altro batterio, anche da quello di *B. cereus*, con altissima specificità e ridotti tempi di lavoro. Come si può vedere dalla

Figura 2, con la tecnica descritta si ottengono due curve di dissociazione delle sonde assolute-

Una tecnica innovativa per l'identificazione di *Bacillus anthracis* è basata sulla tecnologia FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

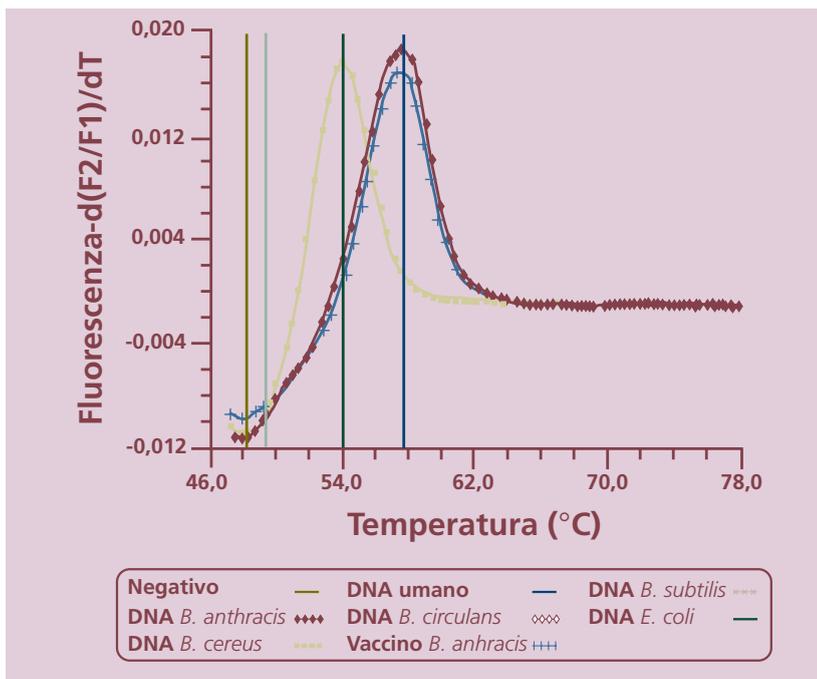


Figura 2 - Rilevazione di *Bacillus anthracis* mediante real-time PCR

mente diverse per il *B. cereus* (T^m 54 °C) e per il *B. anthracis* (T^m 57,6 °C). La stessa curva di dissociazione si ottiene sia per il *B. anthracis* patogeno che per il ceppo vaccinale Carbosap. Non si ottiene alcun segnale di ibridazione sul DNA di altri batteri o sul DNA umano a indicare l'altissima specificità di questa tecnica (5).

PCR identificativa per *Y. pestis*

Y. pestis è l'agente infettivo che causa la peste bubbonica, una malattia fortunatamente molto rara nel mondo e per questo motivo scarsamente studiata a livello molecolare. *Y. pestis* è tuttavia considerato uno dei più probabili agenti infettivi utilizzabili come arma batteriologica a scopi bioterroristici e recentemente sono state studiate nuove procedure di identificazione rapida al fine di supportare in tempo reale un'eventuale conferma diagnostica.

Y. pestis mostra un 90% di omologia di sequenza a livello del DNA cromosomale con *Y. pseudotuberculosis*, un batterio largamente diffuso nell'ambiente. Questo significa che le metodologie molecolari applicabili all'identificazione definitiva di *Y. pestis* devono essere

in grado di riconoscere specificamente queste due specie. Recentemente uno studio condotto negli USA (6), basato sulla tecnica dell'ibridazione sottrattiva, ha permesso di individuare delle regioni uniche nel genoma di *Y. pestis* sul-

le quali è stato possibile disegnare oligonucleotidi specifici da utilizzare per PCR tali da permettere di distinguere *Y. pestis* da *Y. pseudotuberculosis*. La Figura 3a mostra il risultato delle PCR condotte sui DNA di *Y. pestis* (corsia 2), *Y. enterocolitica* (corsia 3) e *Y. pseudotuberculosis* (corsia 4). Il prodotto di PCR presenta il peso molecolare di 276 bp ed è risultato essere specie-specifico perché permette di distinguere *Y. pestis* dalle altre yersinie. Inoltre, gli oligonucleotidi utilizzati non hanno mostrato nessuna reattività crociata con DNA estratto da altri batteri, da agenti virali o da cellule eucariotiche, comprese quelle umane.

PCR identificativa per *F. tularensis*

F. tularensis è un coccobacillo estremamente virulento che causa la tularemia e di cui sono noti più biovar.

L'amplificazione genica per PCR è stata messa a punto per *F. tularensis* quale metodo molecola-

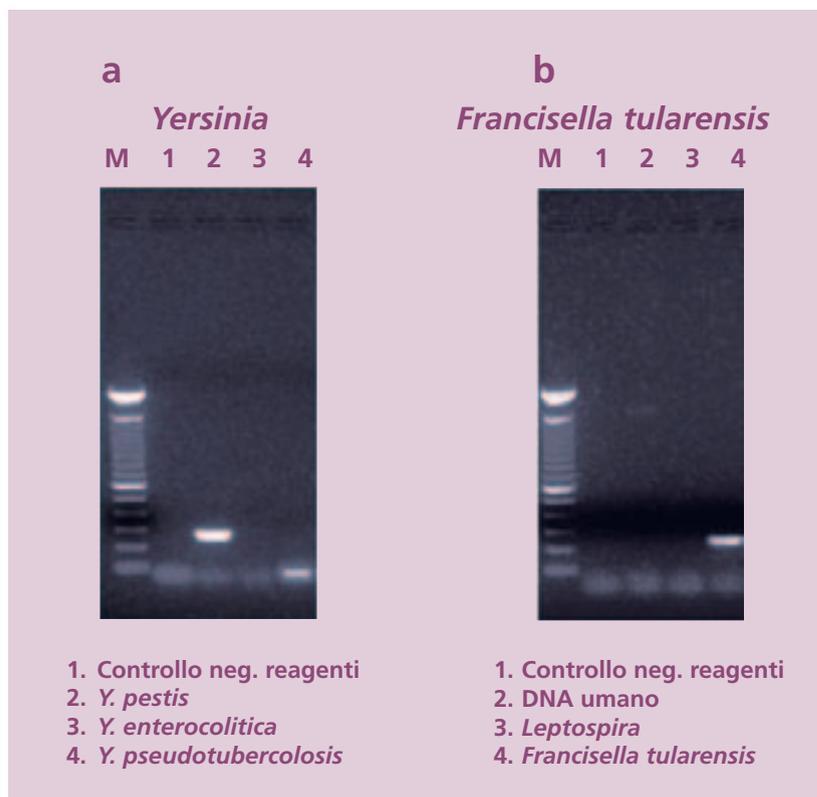


Figura 3 - Identificazione di *Yersinia pestis* e *Francisella tularensis* mediante amplificazione di geni specifici



re rapido e di supporto per la conferma diagnostica. La metodologia e gli oligonucleotidi sono stati recentemente descritti (7). Questa PCR permette l'amplificazione di una regione interna al gene codificante per una proteina di membrana di superficie specifica per questo batterio.

La Figura 3b mostra il risultato delle PCR condotte sul DNA umano (corsia 2) e sui DNA genomici di *Leptospira* (corsia 3) e *F. tularensis* (corsia 4).

Il prodotto di PCR presenta il peso molecolare di 330 bp ed è risultato essere specifico solo per *F. tularensis* poiché non presenta alcuna reattività crociata o produzione di ampliconi con gli altri DNA esaminati. Questo tipo di metodologia è stata usata con successo anche direttamente su campioni biotici di origine umana per la rilevazione del batterio nel sangue in un paziente con sospetta tularemia negli USA (4), nelle secrezioni purulen-

te di un bambino affetto da tularemia ulceroglandulare in Svezia (8) e in aspirati linfonodali di pazienti coinvolti in una recente epidemia avvenuta in Spagna (9). In quest'ultimo caso, l'analisi per PCR è stata eseguita anche su campioni ambientali e prodotti ittici individuati come sorgenti dell'infezione.

Tuttavia, questa metodologia non consente l'individuazione del biovar. A

questo scopo un'altra metodologia basata sull'amplificazione del rDNA 16S di questo batterio, seguita dall'analisi nucleotidica del prodotto amplificato,

consente di individuare all'interno di un frammento di 75 paia di basi del rRNA 16S una regione di "firma", in cui alcune mutazioni puntiformi permettono di differenziare *F. tularensis palaeartica* da *F. novicida* e *F. tularensis* e anche da altri membri del genere *Francisella* quali *F. phylomiragia* (9). Ovviamente questo tipo di analisi non è da ritenersi strettamente ne-

cessario per l'identificazione diagnostica ma può essere utilissimo per la tipizzazione batterica, da attuare per successive valutazioni di carattere epidemiologico e investigativo.

CONCLUSIONI

Le applicazioni di biologia molecolare descritte in questo lavoro sono basate sull'amplificazione genica mediante PCR. Tale metodologia risulta essere un eccellente strumento di diagnostica rapida e di conferma definitiva e nel caso di agenti altamente patogeni rappresenta senza dubbio la procedura più rapida, sensibile, specifica e di elevato livello di sicurezza per l'operatore. È opportuno sottolineare che tali metodiche devono essere eseguite solo in laboratori specializzati e con precedente esperienza specifica, al fine di evitare risultati confondenti o addirittura falsi positivi. Sebbene questa precauzione sia sempre necessaria nella diagnostica, in caso di uso deliberato di agenti infettivi a scopo bioterroristico, tale attenzione diventa assolutamente indispensabile.

Riferimenti bibliografici

1. Ramisse V, Patra G, Garrigue H, et al. FEMS Microbiol Lett 1996; 145: 9-16.
2. Makino SI, Cheun HI, Watarai M, et al. Lett Appl Microbiol 2001; 33: 237-40.
3. Qi Y, Patra G, Liang X, et al. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 3720-7.
4. Fasanella A, Rosito S, Trotta T, et al. Vaccines 2001; 19: 4214-8.
5. Oggioni M, Meacci F, Carattoli A, et al. Real-time PCR for identification of anthrax spores in nasal swabs. (materiale non pubblicato).
6. Radnedge L, Gamez-Chin SG, McCready PM, et al. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 3759-62.
7. Long G, Oprandy J, Narayanan R, et al. J Clin Microbiol 1993; 31: 152-3.
8. Karhukorpi EK, Karhukorpi J. Sand J Infect Dis 2001; 33: 383-5.
9. Anda P, del Pozzo JS, Garcia JMD, et al. Emerg Infect Dis 2001; 7: 575-82.

La metodica relativa all'amplificazione genetica mediante PCR deve essere utilizzata in laboratori specializzati