

# La microbiologia forense e il pericolo del bioterrorismo (2<sup>a</sup> parte)

Maria Nasso, Francesco Saverio Romolo\*

Dipartimento Malattie Infettive Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

\*Dipartimento di Medicina Legale, Roma

## SINTESI

Gli attacchi bioterroristici del 2001 con le lettere contenenti antracce hanno dimostrato che gli agenti patogeni e le tossine possono essere concretamente utilizzati come armi per un attentato terroristico. Per affrontare tali situazioni è nata una nuova disciplina nell'ambito delle scienze forensi, definita microbial forensics (microbiologia forense), che contribuisce alle indagini su un crimine eseguito utilizzando un'arma biologica. L'indagine di microbiologia forense si pone l'obiettivo di identificare l'agente patogeno responsabile, come avviene nel caso di un'indagine epidemiologica, ma con un grado di caratterizzazione molto più elevato. In questo caso si procede con un'analisi genetica per cercare di individuare univocamente la fonte del patogeno utilizzato,

seguendo un approccio comune a tutta la criminalistica, volto a classificare ed eventualmente identificare "le tracce e le cose pertinenti al reato". In seguito agli attacchi del 2001 si è effettuata la genotipizzazione del *B. anthracis* su 8 loci polimorfici VNTR (variable number tandem repeat) con la MLVA (multilocus variable tandem repeat analysis). Recentemente, alcuni gruppi di ricerca hanno aumentato il numero dei loci a 25, mentre un altro gruppo ha individuato un altro tipo di polimorfismi (SNR, single nucleotide repeat) con un maggiore grado di mutazione. Il sistema basato sui markers SNRs permette di distinguere fra isolati batterici che hanno una bassissima variabilità genetica e che mostrano un identico genotipo MLVA.

## La nuova frontiera dei microbial forensics: un network di competenze interdisciplinari per fronteggiare il fenomeno del bioterrorismo

Il bioterrorismo costituisce una problematica di grande rilievo per l'intera comunità internazionale, non esistendo ancora una definizione chiara che possa delimitare con certezza la portata del fenomeno, né una normativa idonea a fornire strategie e strumenti efficaci di contrasto. Nonostante si sia iniziato a parlare di bioterrorismo già in anni precedenti, è nell'ottobre del 2001 che va collocato il primo vero attacco bioterroristico<sup>1,2</sup>. Fu immediatamente evidente che gli strumenti giuridici internazionali (come, ad esempio, la BTWC, *Biological and Toxin Weapons Convention*) possedevano un loro limite in-

trinseco, poiché non tenevano conto della complessità del fenomeno e della sua continua evoluzione<sup>3</sup>. Gli attacchi del 2001 misero in evidenza l'assoluta necessità di sperimentare nuove strategie di lotta al bioterrorismo, basate su una cooperazione massiccia fra tutti gli organi coinvolti, che consentisse un articolato sistema di monitoraggio ed elaborazione delle informazioni scientifiche. Proprio con questo spirito si affrontarono le indagini che seguirono a tali eventi: si avviò subito un'indagine microbiologica<sup>4</sup>, svolta dalla Sanità Pubblica, e un'indagine di tipo forense, svolta dall'FBI, che si avvale della collaborazione di un gruppo di lavoro costituito da scienziati di diverse discipline, noto come *Scientific Working Group on Microbial Genetics and Forensics* (SWGMP)<sup>5</sup>. Si realizzò, così, un'infrastruttura caratterizzata da tools analitici e conoscenze che ebbero come scopo l'esecuzione di un'indagine sugli eventi più rapida ed

efficace<sup>6,7</sup>. Denominatore comune di questo network di competenze fu una nuova disciplina, definita *microbial forensics*, che si poneva l'obiettivo di fornire gli elementi necessari all'indagine giudiziaria per attribuire a uno specifico colpevole<sup>7-9</sup> il crimine perpetrato attraverso l'utilizzo di un agente biologico.

In realtà l'FBI aveva già sfruttato questo tipo di approccio in seguito all'emergenza dei reati sessuali sorta a metà degli anni Novanta, istituendo un gruppo di lavoro specializzato. Lo scopo era stato quello di promuovere la redazione di linee guida che permettesse di utilizzare l'analisi genetica del DNA umano effettuata in laboratorio nell'ambito di un processo penale<sup>10,11</sup>. Dopo il 2001 si tentò di raggiungere lo stesso contributo scientifico alle indagini, sfruttando i risultati già ottenuti con gli studi realizzati dalla Sanità Pubblica nell'ambito delle malattie infettive, soprattutto da parte dei *Centers for Disease Control and Prevention* (CDCs), laboratori deputati al controllo e alla prevenzione di queste malattie<sup>12</sup>. Quando si cominciò, poi, a percepire il rischio di un potenziale utilizzo di agenti biologici per un attacco terroristico, i CDCs entrarono a far parte del *Laboratory Response Network*, una rete organizzata per realizzare una più rapida identificazione degli agenti utilizzati e, quindi, potenziare la risposta a un possibile attacco con queste armi<sup>13,14</sup>.

Il *Laboratory Response Network* doveva raccordare laboratori sanitari locali con laboratori centrali altamente specializzati (i CDCs appunto), classificati a seconda del livello di sicurezza richiesto (*Biosafety level*, BSL) in ordine crescente come BSL1, BSL2, BSL3 e BSL4, idonei a operare in condizioni di rischio controllate, avvalendosi delle più moderne tecniche di analisi<sup>15</sup>, secondo procedure operative standardizzate e validate in costante aggiornamento<sup>16-18</sup>.

Ai CDCs fu affidato il compito di realizzare corsi di formazione per gli operatori che dovevano lavorare con i patogeni "a rischio". Nel 2000 fu realizzato il *Bioterrorism Preparedness and Response Program*, organizzato in quattro sessioni di lavoro, dedicate allo studio di *B. anthracis*, *Brucella Spp*, *Yersinia pestis* e *Francisella Tularensis*. In queste sessioni, a cui partecipò anche l'FBI, furono descritti i criteri fondamentali per l'identificazione primaria e di conferma dei patogeni<sup>15</sup> e furono distribuiti i protocolli contenenti le metodiche a cui attenersi<sup>19</sup>. Tali protocolli erano stati sviluppati dal SWGMGF e definiti come *Quality Assurance Guidelines for Laboratories Performing Microbial Forensic Work*<sup>20</sup>. In queste linee guida erano descritti, oltre alle procedure analitiche e alla validazione dei metodi, anche le procedure di sicurezza e il personale idoneo a lavorare nell'ambito di un'indagine di microbiologia forense<sup>21</sup>. Molti punti riportati nel programma di *Quality Assurance* stilato dal SWGMGF furono riproposti nelle linee guida più ge-

nerali, formulate circa un anno dopo dall'*International Standards Organization* (ISO) a cui tutti i laboratori con certificazione di qualità avrebbero dovuto fare riferimento. L'idea di affidare ai laboratori accreditati dei CDCs il compito di effettuare e coordinare le indagini a seguito di un attacco bioterroristico derivò dal fatto che le analisi svolte nei laboratori microbiologici, principalmente a scopo di diagnosi medica o di monitoraggio epidemiologico, sono per lo più le stesse analisi che sottendono ai *microbial forensics*<sup>22</sup>.

## Il sopralluogo in microbiologia forense

Un'indagine di microbiologia forense segue gli stessi principi di un'indagine forense classica di tipo criminalistico. L'attività ha sempre inizio sulla scena di un crimine e presuppone i due principi della criminalistica. Nel caso dell'attacco bioterroristico il criminale lascia deliberatamente il materiale pericoloso sulla scena del crimine (principio di Locard). In realtà possono essere individuate più scene del crimine: il luogo o i luoghi di preparazione e conservazione degli strumenti dell'attacco, quello di spedizione e/o quello di rilascio. In tutti questi luoghi il materiale pericoloso può essere suddiviso in più parti grazie alla sua divisibilità: la suddivisione potrà essere operata volontariamente, ad esempio per realizzare più lettere contenenti spore di *Bacillus anthracis*, o involontariamente, lasciando tracce che potranno essere utili alle indagini una volta identificate.

La scena non deve essere semplicemente individuata e protetta da alterazioni e contaminazioni esterne, ma deve essere prima di tutto trattata come il luogo di un'emergenza, dove al problema dell'esercizio dell'azione penale si aggiungono i rischi per la salute pubblica e la pubblica sicurezza. È necessario, infatti, evitare che l'agente patogeno sia disperso, rendendo più gravi le conseguenze del crimine e, qualora questo non sia possibile, si devono allontanare coloro che rischiano di essere contagiati. Allo stesso tempo è necessario prestare soccorso alle eventuali vittime. Durante le attività necessarie a risolvere l'emergenza, le uniche tipicamente criminalistiche che possono essere svolte sono la realizzazione di riprese video e di rilievi descrittivi, fotografici ed eventualmente planimetrici, da posizioni che garantiscano la sicurezza degli operatori. In tutte queste operazioni, infatti, come in quelle successive di prelievo, trasporto e analisi dei campioni, è di fondamentale importanza che gli operatori lavorino in condizioni di massima sicurezza<sup>23</sup>. Una volta che l'area di pericolo risulta circoscritta, è possibile individuare uno o più punti d'accesso alla scena del crimine, definire le procedure di entrata e uscita degli specialisti e di raccolta e trasporto dei campioni da prelevare. Gli specialisti devono quindi realizzare i rilie-

vi necessari a descrivere in modo esauriente la scena del crimine. Terminata la fase dei rilievi è possibile raccogliere i reperti sui quali effettuare accertamenti di laboratorio. La raccolta deve essere svolta garantendo la così detta "catena di custodia", attraverso procedure che impediscano la dispersione o la sostituzione del materiale o almeno consentano di verificare che dispersioni e sostituzioni non si siano verificate a partire dalla scena del crimine. La caratteristica peculiare dell'indagine forense microbiologica è che i reperti rappresentano un rischio biologico, quindi deve essere garantita la salute degli operatori e di terzi al momento del prelievo, durante il trasporto, la conservazione e gli accertamenti.

### Le indagini di laboratorio

Nella fase di laboratorio e di interpretazione dei risultati emergono ancor più chiaramente le differenze fra un'indagine epidemiologica e un'indagine forense condotta su un microorganismo. Secondo quanto descritto nel rapporto conclusivo di un convegno tenutosi nel 2003 negli Stati Uniti, redatto dall'*American Academy of Microbiology*, «le scienze forensi hanno pretese molto più stringenti rispetto alla scienza epidemiologica: in primo luogo il mantenimento di una catena di custodia per i campioni che sono sottoposti ad analisi e, in secondo luogo, la necessità, per le scienze forensi, di identificare il microbo con un grado di dettaglio molto più alto»<sup>24,25</sup>. Nella criminalistica è necessario partire da una classificazione delle tracce pertinenti il reato per giungere, ove possibile, all'identificazione della fonte di tale traccia e alla ricostruzione della sequenza di eventi<sup>26</sup>. Dal punto di vista metodologico, l'investigazione microbiologica forense si pone, dunque, l'obiettivo di individuare l'esatta variante genomica, piuttosto che la più semplice caratterizzazione fenotipica. L'individuazione della natura del microorganismo responsabile del contagio, che risulta sufficiente per un'analisi epidemiologica, non lo è per assicurare il responsabile di una condotta criminale alla giustizia. Solo con l'analisi genetica (DNA *fingerprinting*) si può risalire alla fonte dell'agente biologico e, quindi, a coloro che, verosimilmente, avrebbero potuto avere accesso a quella fonte, procurandosi l'agente patogeno da utilizzare, successivamente, per un attacco bioterroristico<sup>24</sup>. Una tipica indagine di *microbial forensics*, quindi, accanto all'impiego delle più classiche procedure di analisi microbiologica, si avvale dello studio dei polimorfismi, analogamente a quanto avviene per l'analisi forense del DNA umano. I polimorfismi sono variazioni nel genoma che consistono di mutazioni spontanee puntiformi a carico di un singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphism*, SNP), oppure di mutazioni che comportano variazioni nella lunghezza di un determinato locus genico, poiché caratterizzate da un diverso numero di ripetizioni

di determinate sequenze di DNA all'interno di un frammento specifico (*copy number polymorphism*, CNP). Nell'ambito delle CNP si distinguono i microsatelliti (*short tandem repeats*, STR) e i minisatelliti (*variable number tandem repeats*, VNTR) che consistono di sequenze ripetute in tandem contenenti 10-20 nucleotidi, particolarmente abbondanti nei microrganismi<sup>27,28</sup>. Da quando sono iniziati i primi studi sui polimorfismi, sono stati messi a punto diversi approcci e lo sviluppo di tecniche sempre più rapide e affidabili ha subito, nel tempo, un notevole progresso sia in termini di qualità sia di quantità di analisi effettuabili: se si considera che il genoma umano arriva a contenere miliardi di nucleotidi, è evidente come il fattore limitante in questo tipo di indagine sia rappresentato proprio dalla dimensione del genoma e, quindi, dalle tecniche usate per analizzarlo. Oggi gli approcci che forniscono i risultati più rapidi e attendibili sono tutti basati sull'amplificazione dei frammenti di DNA attraverso la ben nota tecnica della *polymerase chain reaction* (PCR)<sup>29</sup>.

È importante notare che lo studio dei polimorfismi, applicato alle scienze forensi, non è cosa recente ma già da molto tempo era stato messo a punto per l'analisi del DNA umano, consentendo di individuare, ad esempio, le tracce di DNA rinvenibili sulla vittima e provenienti da un determinato soggetto, sospettato come autore del reato, oppure per effettuare un'identificazione di familiarità fra due individui.

Quando si pensò di applicare questo tipo di approccio a una caratterizzazione genotipica di un isolato batterico o di un virus, ci si scontrò con una serie di problemi: nel caso dei microbi era necessario preliminarmente identificare con certezza quale fosse il patogeno coinvolto, inoltre bisognava considerare che i virus e la maggior parte dei batteri sono aploidi e, quindi, si riproducono per via asessuata, per ricombinazione o duplicazione genica. Per questo motivo le metodologie analitiche e statistiche, oltre che l'interpretazione dei risultati, si dovevano avvalere di *tools* differenti rispetto a quelli utilizzati correntemente per analizzare il profilo diploide del DNA umano<sup>30</sup>. Infine, al contrario del genoma umano, fortemente ridondante, gli organismi inferiori hanno un genoma molto meno complesso e, quindi, con un numero di polimorfismi molto più ridotto<sup>31</sup>. Il *Bacillus anthracis*, in particolare, rappresenta uno dei batteri geneticamente più monomorfi, poiché rimane per lungo tempo nello stato dormiente di spora a elevata sopravvivenza.

Secondo recenti studi, la probabilità che all'interno del genoma del *B. anthracis* subentri una mutazione SNP è pari a un valore di  $10^{-10}$  mutazioni per nucleotide per generazione, quindi estremamente bassa, mentre per un polimorfismo VNTR è stato stimato un valore molto più alto, compreso fra  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  muta-

zioni per generazione, contro quello di  $10^{-3}$  per gli altri batteri<sup>32</sup>. È per questo motivo che la genotipizzazione del *B. anthracis* viene effettuata proprio analizzando i polimorfismi VNTR, nonostante siano stati sviluppati metodi di analisi sui polimorfismi SNP<sup>33</sup>. Alla luce di quanto sinora considerato, risulta evidente, quindi, che per un'analisi genetica svolta a scopo forense (*microbial forensics*) è necessario proporsi due obiettivi fondamentali: individuare un appropriato tipo di polimorfismo da analizzare<sup>34</sup> e raggiungere il più elevato grado di certezza possibile o, più correttamente, consentire l'apprezzamento del rapporto tra la probabilità dell'ipotesi dell'accusa e quella della difesa, dato un elemento di prova<sup>35,36</sup>.

Le indagini che seguirono l'attacco bioterroristico del 2001 furono svolte scegliendo quelle metodiche che nel tempo avevano fornito le migliori garanzie<sup>37</sup>. Il *B. anthracis* possiede un DNA cromosomico e due plasmidi, pOX1<sup>38</sup> e pOX2<sup>39</sup>, sui quali si trovano i geni codificanti per i fattori di virulenza: la capsula<sup>40</sup> nel primo e la tossina dell'antrace<sup>41</sup> nel secondo, la quale è costituita da 3 subunità, *letal factor* (LF), *edema factor* (EF) e *protective antigen* (PA), ognuna codificata da un gene diverso<sup>42</sup>. Proprio sul *B. anthracis* furono sviluppati numerosi studi con lo scopo di individuarne i polimorfismi fino a quando, tra il 1996 e il 1997, due gruppi di scienziati arrivarono all'identificazione di 8 loci genici contenenti sequenze VNTR, che mostrarono un elevato grado di variabilità fra i diversi ceppi analizzati<sup>43,44</sup>. Per l'identificazione di questi loci furono sequenziati diversi frammenti di DNA attraverso la tecnica *amplified fragment length polymorphism* (AFLP)<sup>45</sup>, utilizzata anche per la determinazione delle relazioni filogenetiche del bacillo dell'antrace con gli altri bacilli della stessa famiglia (*B. cereus* e *B. thuringiensis*)<sup>43,44,46</sup>. In particolare, 6 degli 8 loci polimorfici furono individuati sul DNA cromosomiale (CG3, *vrA*, *vrB1*, *vrB2*, *vrC1*, *vrC2*) e altri due (pOX2-at e pOX1-aat) sui due plasmidi<sup>43,44</sup>.

Nel 1999 altri studi si focalizzarono sull'analisi del tratto di DNA del plasmide pOX2, contenente il gene *pagA*, codificante per il fattore di protezione antigenico (PA), a cui è associato lo sviluppo dell'immunità verso il carbonchio<sup>47</sup>. La tipizzazione di questo locus portò alla caratterizzazione di 6 genotipi differenti e ha rappresentato una scoperta molto importante, perché può fornire informazioni utili circa la possibilità che il batterio usato per l'attacco bioterroristico sia stato ingegnerizzato, ad esempio, per aumentarne la patogenicità<sup>48</sup>. Nel 2000 gli stessi gruppi di scienziati che individuarono le sequenze VNTR per il *B. anthracis* misero a punto una nuova tecnica di analisi dei polimorfismi, sfruttando gli stessi loci polimorfici individuati in precedenza, e nota come

*multiple locus variable number of tandem repeat analysis* (MLVA), impiegata oggi di routine per la determinazione genomica del *B. anthracis* e utilizzata con successo anche per lo studio dei polimorfismi di altri patogeni molto conservati, come *Yersinia pestis*<sup>49-51</sup> e *Francisella tularensis*<sup>52,53</sup>, anch'essi considerati agenti patogeni utilizzabili a scopo bioterroristico.

Lo studio con la MLVA fu condotto sui 419 ceppi di *B. anthracis* isolati in tutto il mondo e consentì di determinare 89 differenti genotipi, i quali filogeneticamente discendono tutti da sei grandi gruppi genetici ancestrali del *B. anthracis*<sup>54</sup>. Rispetto alla AFLP, con questa tecnica è possibile analizzare un numero di sequenze di DNA elevatissimo in un tempo molto più breve.

Nella Tabella 1 sono riportati gli isolati batterici, classificati per regione, su cui l'analisi venne effettuata e a cui furono attribuiti i diversi genotipi, mentre in Figura 1 è riportato l'albero filogenetico costruito proprio grazie alla tipizzazione genetica. Nella Tabella 2, invece, sono riportati i genotipi associati non solo alle regioni ma anche ai centri che ufficialmente li possiedono. Grazie a questi studi condotti nel 2000 è possibile individuare specificamente la fonte ufficiale di ogni ceppo di *B. anthracis* isolato. Fu presto evidente, però, che la MLVA messa a punto sugli 8 loci descritti (MLVA8) non forniva un elevato grado di discriminazione fra i diversi genotipi, per cui risultava molto limitante sia per un'indagine epidemiologica sia per un'indagine forense.

Poco tempo dopo furono individuati ulteriori loci polimorfici, fino a quando, un anno dopo, il gruppo di Le Flèche pubblicò i propri risultati, proponendo 14 sequenze VNTR aggiuntive<sup>55</sup>. L'ultimo risultato raggiunto in questo senso, però, si è ottenuto con il lavoro di Lista e collaboratori, pubblicato recentemente su *BMC Microbiology*, in cui viene riportato un sistema di genotipizzazione molto rapido, accurato e riproducibile. In particolare, sono state individuate altre 4 sequenze polimorfiche identificative che, aggiunte al pannello elaborato da Le Flèche nel 2001, hanno permesso di aumentare il numero di loci VNTR da 21 a 25 (MLVA25), sfruttando un sistema di analisi MLVA basato su un metodo automatizzato di elettroforesi capillare. I dati ottenuti con l'elettroforesi capillare hanno confermato quanto era già stato dimostrato nei lavori precedenti, ma hanno permesso di risolvere nuovi alleli che con le tecniche di separazione su gel d'agarosio non era stato possibile separare. Il metodo di genotipizzazione messo a punto da Lista e collaboratori, a oggi, è quello che fornisce il massimo grado di discriminazione genotipica del *B. anthracis*, effettuabile con un costo contenuto e in un tempo sufficientemente breve<sup>56</sup>.

Di recente, un altro gruppo di ricerca ha messo a punto un nuovo metodo di genotipizzazione, avvalendosi di

TAB. 1

Isolati di *B. anthracis* sui quali fu effettuata l'analisi tramite la *multiple locus variable number of tandem repeats analysis* (MLVA) (Keim<sup>54</sup>).

Continente	Regione (sigla)	Numero di isolati	Numero di genotipi
Africa	Mozambico (MOZ)	5	4
	Namibia (NAM)	23	7
	Sud Africa (SAF)	127	9
	Tanzania (TANZ)	5	1
	Zambia (ZAM)	17	2
	Zimbabwe (ZIM)	4	2
	<b>Subtotale</b>	<b>181</b>	<b>18</b>
Asia	Cina	7	5
	India	3	2
	Indonesia (INDO)	5	4
	Pakistan (PAK)	4	4
	Corea del Sud (KOR)	4	2
	Turchia (TURK)	41	12
	<b>Subtotale</b>	<b>64</b>	<b>31</b>
Australia		<b>30</b>	<b>3</b>
Europa	Croazia (CRO)	1	1
	Francia (FRA)	8	3
	Germania (GER)	9	5
	Ungheria (HUN)	3	2
	Irlanda (IRE)	1	1
	Italia	3	2
	Norvegia (NOR)	5	5
	Polonia (POL)	1	1
	Slovacchia (SLO)	3	2
	Spagna (SPA)	2	1
	Svizzera (SWI)	2	2
	Gran Bretagna (UK)	19	10
	<b>Subtotale</b>	<b>57</b>	<b>32</b>
Nord America	Canada (CAN)	51	7
	Haiti	1	1
	Stati Uniti (USA)	32	16
	<b>Subtotale</b>	<b>84</b>	<b>22</b>
Sud America	Argentina (ARG)	2	2
	Brasile (BRA)	1	1
	<b>Subtotale</b>	<b>3</b>	<b>3</b>
<b>TOTALE</b>		<b>419</b>	<b>89</b>

un approccio *in silico*, basato sull'analisi delle SNRs (*single nucleotide repeat*)<sup>57</sup>, variazioni ripetute di mononucleotidi, appartenenti al genere di polimorfismi VNTR, ma con un grado di mutazione ancora più elevato<sup>34</sup>. Le sequenze SNRs sono state identificate in un discreto numero di batteri e già erano state oggetto di studio per la tipizzazione genotipica di alcuni di essi<sup>58-60</sup>. Attraverso lo studio di questi polimorfismi sul *B. anthracis* è stato possibile discriminare isolati o *strain* batterici che hanno una diversità genetica estremamente bassa. In particolare, si sono potuti differenziare isolati di *B. anthracis* che, analizzati con la MLVA, avevano presentato un identico genotipo<sup>57</sup>.

Questo tipo di approccio non è indicato per individuare le relazioni filogenetiche, per le quali risulta più appropriata l'analisi MLVA. Piuttosto, risulta particolarmente efficace per gli studi epidemiologici o per un'indagine in ambito forense in cui è richiesto il più elevato grado di discriminazione genetica fra gli isolati batterici.

### Le attività svolte in seguito agli attacchi bioterroristici del 2001

Le indagini che si svolsero dopo gli attentati bioterroristici del 2001 con *B. anthracis* partirono dai risultati che si erano ottenuti, nel 2000, con il lavoro svolto dal

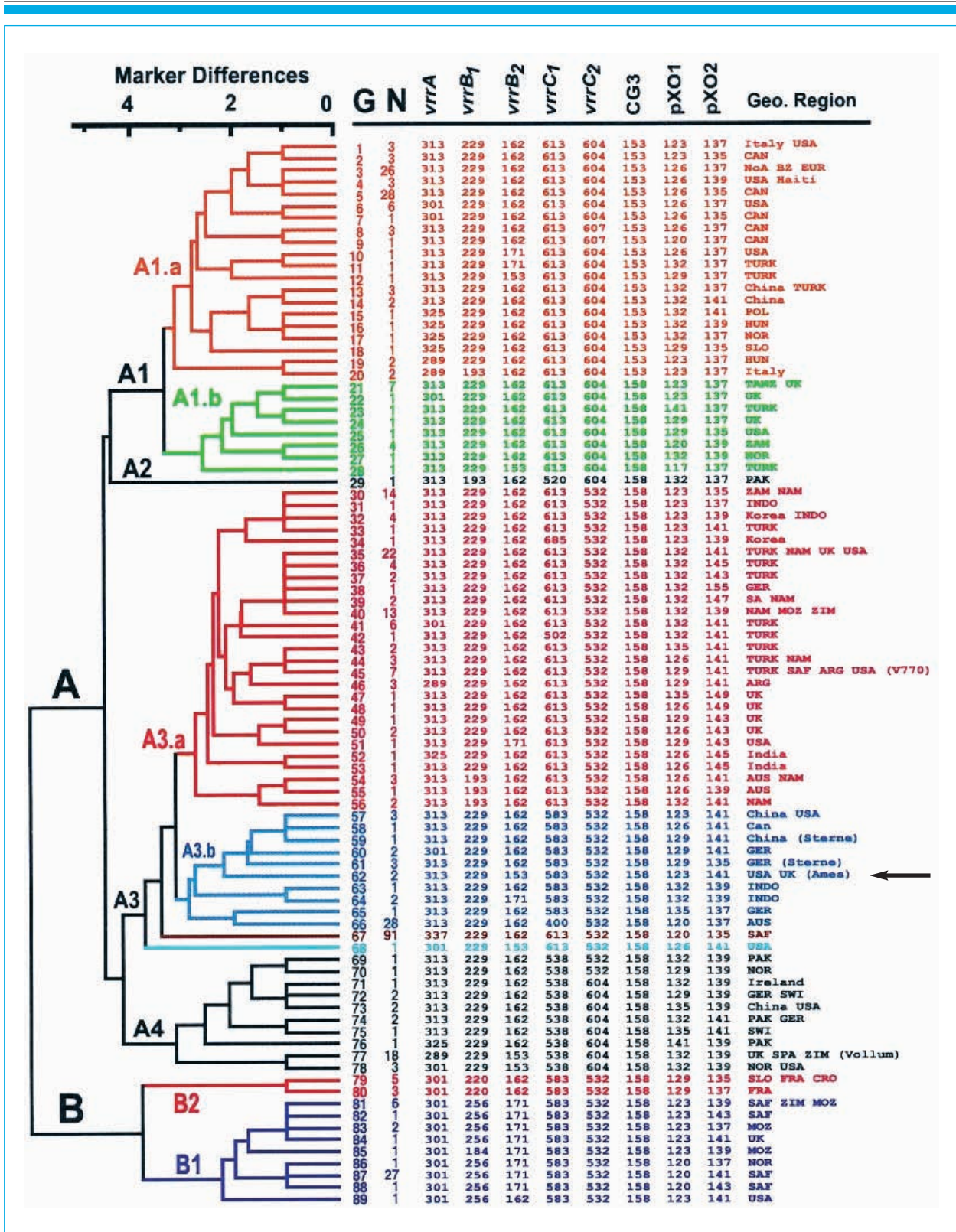


Fig. 1 - Albero filogenetico ricostruito in base ai diversi genotipi determinati tramite la multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). L'albero mette in relazione i genotipi (G), classificati numericamente da 1 a 89, le regioni geografiche di provenienza degli isolati batterici, come classificati nella Tabella 1 (Geo. Region), a cui è stato associato un determinato genotipo, le regioni polimorfiche variable number tandem repeat (VNTR) attraverso le quali sono stati ricostruiti i rapporti filogenetici fra i diversi isolati (cluster). Lo strain di appartenenza dell'isolato di B. anthracis utilizzato per l'attacco bioterroristico del 2001 è l'Ames corrispondente al genotipo 62<sup>54</sup>.

emergency care journal - organizzazione, clinica, ricerca • Anno III numero II • Aprile 2007 • www.ecj.it

TAB. 2

Associazione dei genotipi determinati con *la multiple locus variable number of tandem repeat analysis* (MLVA) con gli isolati di *B. anthracis* e con i centri in cui ognuno di essi ufficialmente si trova<sup>54</sup>.

Genotipo	Regione	Fonte*	Genotipo	Regione	Fonte*
1	Italia	IZS	46	Argentina	GELAB
2	Canada	ADRI	47	Gran Bretagna	CAMR
3	Canada	ADRI	48	Gran Bretagna	CAMR
4	Iowa	USAMRIID	49	Gran Bretagna	CAMR
5	Canada	ADRI	50	Scozia	CAMR
6	Texas	TVMDL	51	Maryland	USAMRIID
7	Canada	USAMRIID	52	India	CMCH
8	Canada	ADRI	53	India	CMCH
9	Canada	ADRI	54	Namibia	DRM
10	S. Dakota	ADRDL	55	Australia	CAMR
11	Turchia	EM	56	Namibia	DRM
12	Turchia	EM	57	Cina	CAMR
13	Cina	CAMR	58	Canada	ADRI
14	Cina	CAMR	59	Cina	IEM
15	Polonia	VMRI	60	Germania	IUTSTT
16	Ungheria	VMRI	61	Germania	IUTSTT
17	Norvegia	CVL	62	Gran Bretagna	USAMRIID
18	Slovacchia	IUTSTT	63	Indonesia	RIVS
19	Ungheria	VMRI	64	Indonesia	RIVS
20	Italia	IZS	65	Germania	IUTSTT
21	Inghilterra	CAMR	66	Australia	EMAI
22	Inghilterra	CAMR	67	Sud Africa	KNP
23	Turchia	EM	68	Ohio	USAMRIID
24	Inghilterra	CAMR	69	Pakistan	USAMRIID
25	Florida	ATCC	70	Norvegia	CVL
26	Zambia	CAMR	71	Irlanda	USAMRIID
27	Norvegia	CVL	72	Germania	IUTSTT
28	Turchia	EM	73	Cina	CAMR
29	Pakistan	VRI	74	Pakistan	IUTSTT
30	Zambia	CVLL	75	Svizzera	IUTSTT
31	Indonesia	RIVS	76	Pakistan	USAMRIID
32	Corea del Sud	DMNIH	77	Gran Bretagna	CAMR
33	Turchia	EM	78	Norvegia	CVL
34	Corea del Sud	DMNIH	79	Francia	IP
35	Namibia	DRM	80	Francia	IP
36	Turchia	EM	81	Sud Africa	USAMRIID
37	Turchia	EM	82	Sud Africa	USAMRIID
38	Germania	IUTSTT	83	Mozambico	INV
39	Namibia	DRM	84	Gran Bretagna	CAMR
40	Namibia	CAMR	85	Mozambico	INV
41	Turchia	EM	86	Norvegia	CVL
42	Turchia	EM	87	Sud Africa	KNP
43	Turchia	EM	88	Sud Africa	USAMRIID
44	Namibia	USAMRIID	89	North. Carolina	USAMRIID
45	Argentina	GELAB			

\* **ADRDL**: Animal Disease Research and Diagnostic Laboratory, South Dakota State University; **ADRI**: Animal Diseases Research Institute, Alberta, Canada; **ATCC**: American Type Culture Collection, Manassas, Va.; **CAMR**: Center for Applied Microbiology and Research, Porton Down, United Kingdom; **CMCH**: Christian Medical College and Hospital, Tamil Nadu, India; **CVL**: Central Veterinary Laboratory, Oslo, Norway; **CVLL**: Central Veterinary Laboratory, Lusaka, Zambia; **DMNIH**: Department of Microbiology, National Institute of Health, Seoul, South Korea; **DRM**: Directorate of Resource Management, Windhoek, Namibia; **EM**: Enstutusu Muduriugu, Ankara, Turkey; **EMAI**: Elizabeth MacArthur Agricultural Institute, New South Wales, Australia; **GELAB**: Department Bacteriologia General, Buenos Aires, Argentina; **IEM**: Institute of Epidemiology and Microbiology, Changping, China; **INV**: Instituto Nacional de Veterinaria, Maputo, Mozambique; **IP**: Institut Pasteur, Paris, France; **IUTSTT**: Institut für Umwelt und Tierhygiene Sowie Tiermedizin mit Tierklinik, Stuttgart, Germany; **IZS**: Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Foggia, Italy; **KNP**: Kruger National Park, South Africa; **RIVS**: Research Institute for Veterinary Science, Bogor, Indonesia; **TVMDL**: Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, College Station, Texas; **USAMRIID**: United States Army Medical Research Institute for Infectious Diseases, Maryland; **VMRI**: Veterinary Medical Research Institute, Budapest, Hungary; **VRI**: Veterinary Research Institute, Lahore, Pakistan.

gruppo di Keim, sfruttando, per la prima volta, un complesso network di competenze<sup>5,20</sup>. L'indagine della Sanità Pubblica, infatti, si arrestò nel momento in cui fu individuato il patogeno responsabile del contagio. L'indagine forense, invece, necessitava della determinazione dell'esatto sottotipo del ceppo batterico in modo da circoscriverne l'origine<sup>24</sup>.

Generalmente, nella diagnostica microbiologica, l'identificazione definitiva dell'isolato batterico avviene tramite l'esecuzione di test di caratterizzazione biochimica o antigenica che richiedono la manipolazione e la crescita in coltura del microrganismo. L'indagine si concentra sulla determinazione delle differenze fenotipiche tra il bacillo dell'antrace e gli altri componenti della famiglia, analizzando la perdita della motilità, della capacità di indurre emolisi, la suscettibilità alla penicillina e la morfologia della colonia. Accanto a questo tipo di approccio identificativo, in questi ultimi anni sono state messe a punto tecniche di biologia molecolare che garantiscono una maggiore sicurezza all'operatore, offrono la possibilità di analizzare campioni inattivati o direttamente il DNA estratto, oltre che fornire un'identificazione certa del microrganismo responsabile<sup>61</sup>. L'indagine forense in seguito agli attacchi bioterroristici con *B. anthracis*, invece, procedette con l'identificazione dei polimorfismi, allo scopo di individuare quale fosse la variante genomica del ceppo batterico. L'analisi fu condotta sugli stessi campioni che erano stati collezionati per l'indagine diagnostica, e in particolare su diversi liquidi e tessuti biologici delle vittime (sangue, liquido cerebrospinale, linfonodi ecc.) oltre che sulle polveri contenute nelle lettere (ai laboratori dei CDCs arrivarono più di 125.000 campioni)<sup>24</sup>.

Lo studio fu effettuato sia con la MLVA per gli 8 loci polimorfici noti, sia sul gene *pagA* per determinare un'eventuale manipolazione genetica del batterio. I risultati dimostrarono che in tutti i campioni era presente lo stesso ceppo di batterio, corrispondente al sottotipo *Ames*, un ceppo presente in molti laboratori di ricerca, isolato negli anni Ottanta, sul quale si basarono molti studi sull'antrace, mentre il sequenziamento del *pagA* dimostrò che il batterio non era stato ingegnerizzato<sup>37</sup>.

Dall'esperienza appena riportata emerse inequivocabilmente come la migliore delle strategie alle quali affidare il contrasto del fenomeno emergente del bioterrorismo non poteva che essere improntata ai fondamentali criteri dell'interdisciplinarietà e della condivisione delle informazioni scientifiche, nella prospettiva di una rielaborazione di queste ultime in un'ottica prevalentemente investigativa. Il consolidarsi di questo tipo di approccio portò, alla fine del 2005, alla determinazione di uno dei più grandi database oggi disponibili, denominato *Microbial Rosetta Stone Database*, che raccoglie tutti i microrganismi esistenti e gli agenti patogeni emer-

genti, potenzialmente utilizzabili per un attacco bioterroristico, associati alla loro classificazione tassonomica, alle varianti genomiche conosciute, alle malattie connesse, ai protocolli terapeutici e alle metodiche diagnostiche<sup>62</sup>. Il database fornisce, inoltre, un sistema di collegamento rapido e completo con tutte le banche dati mondiali e rappresenta il risultato vincente di un approccio multidisciplinare per la lotta al bioterrorismo, che ha fatto della specificità tecnica e della dinamicità scientifica la propria forza<sup>63</sup>.

L'emergenza bioterrorismo, però, non ha contraddistinto solo gli Stati Uniti, ma in tutti i Paesi occidentali, compresa l'Italia, il rischio di episodi di terrorismo con armi non convenzionali è divenuto più plausibile. Tutti i Paesi, infatti, immediatamente dopo il 2001 hanno convenuto sul fatto che risposte rapide a questo tipo di emergenze non potevano essere assicurate se non esisteva un'attività di preparazione continua a monte dell'evento. Ma, soprattutto, anche se la risposta a eventuali emergenze non era solo di competenza del settore sanitario, era ovvia la necessità di preparare e, quando necessario, mobilitare il Servizio Sanitario alla cooperazione con le forze di soccorso, di difesa e di sicurezza interna. Poco dopo gli attentati terroristici negli USA venne pubblicata dal Ministero della Salute la relazione sullo stato sanitario dell'Italia per l'anno 2001-2002, dove furono descritte le iniziative assunte nel nostro Paese per fronteggiare le conseguenze di un'eventuale emergenza in seguito a un attacco bioterroristico<sup>64</sup>. Le iniziative intraprese dagli Enti istituzionalmente coinvolti si sono articolate in tre fasi: gestione dell'emergenza, ricognizione delle risorse ed elaborazione e divulgazione del Piano Nazionale di Difesa per il Settore Sanitario. Nell'ambito della fase di gestione dell'emergenza è stata costituita, presso il Ministero della Salute, "l'Unità di crisi", un gruppo di lavoro formato da specialisti nel campo delle malattie infettive, dell'ematologia, della sicurezza, della prevenzione e della sanità militare. Elemento cardine della fase iniziale è stata l'istituzione di un numero verde (800.571.661), che avrebbero potuto contattare cittadini e operatori sanitari per registrare le segnalazioni, valutarne la qualità, smistarle verso le strutture competenti e ritrasmetterle alle istituzioni. È stato, inoltre, stilato un protocollo per la gestione dei materiali sospetti per possibile contaminazione da spore di *Bacillus anthracis*, in cui è stabilito quale materiale fosse da considerare sospetto, le procedure per l'allerta, le modalità di prelievo e trasporto e il trattamento per l'inattivazione del probabile contaminante<sup>64</sup>. Come centro di riferimento nazionale per l'antrace è stato designato, dal Ministero della Salute, l'Istituto Zooprofilattico di Puglia e Basilicata (CeRNA), con sede a Foggia, che già era deputato all'allestimento dei due vaccini contro il carbonchio ematico, *Carbosap* e *Pasteur1*, e



alla sperimentazione del nuovo vaccino *Sterne*. Il centro ha il compito di effettuare il test di rilevamento delle spore di antrace in campioni sospetti (con eccezione dei sospetti clinici umani) nell'ambito dell'emergenza bioterrorismo<sup>65</sup>, che consiste nell'amplificazione, tramite PCR, di sequenze nucleotidiche specifiche per il cromosoma, il fattore letale, il fattore edemigeno, l'antigene protettivo e la capsula di *Bacillus anthracis*.

Con riferimento alle modalità operative, invece, il Ministero della Salute ha disposto che i campioni sospetti (buste, lettere o altro materiale contenente polveri), individuati a livello locale, vengano prelevati dal corpo dei Vigili del Fuoco, trasportati al presidio ospedaliero più vicino munito di autoclave e immediatamente sterilizzati a 121 °C per 45 minuti, prima di essere inviati al centro. Questa misura riduce al minimo la possibilità di diffusione di materiale patogeno nell'ambiente e garantisce la sicurezza degli operatori in tutte le fasi, dal trasporto alla lavorazione<sup>65</sup>. Al centro, inoltre, è stato anche affidato il compito di aggiornare costantemente la mappa dei genotipi italiani di *B. anthracis*<sup>66</sup>. In particolare, dopo una serie di studi che si sono susseguiti negli anni, sono stati identificati, nel nostro Paese, 64 ceppi di *B. anthracis*, isolati da focolai carbonchiosi in Puglia, Campania, Basilicata, Calabria, Toscana, Sicilia, Sardegna, Lazio e Veneto. Tra essi sono stati individuati 10 genotipi differenti (denominati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla J), tutti appartenenti al cluster A1.a, a eccezione di un singolo isolato (J), associato al cluster A3.b<sup>66</sup>. Con il lavoro di Lista e collaboratori si è riusciti a discriminare ulteriormente i 64 isolati batterici in 34 genotipi<sup>56</sup>, piuttosto che nei 10 individuati dall'Istituto Zooprofilattico.

Nella seconda fase delle iniziative intraprese all'indomani del 2001, è proseguita la ricognizione dei presidi utili e di provata efficacia in caso di emergenza, della disponibilità di posti letto nei reparti per malattie infettive oltre che delle scorte di farmaci e vaccini. La ricognizione è stata effettuata anche a livello locale, presso le Regioni, in relazione alla disponibilità, sui territori di rispettiva competenza, non solo di presidi farmacologici, ma anche di laboratori di livello BSL3 e BSL4 per la gestione di agenti infettivi a fini diagnostici.

In ultimo, il Ministero della Salute ha fornito agli organi regionali il Piano di Difesa per il Settore Sanitario, redatto dalla Direzione Generale della Prevenzione con il supporto dell'ISS e dell'ISPESL e approvato dall'Unità di crisi. Una parte del Piano, contenente informazioni utili circa le procedure di intervento più idonee da sviluppare in sede locale, è stata resa accessibile soltanto agli operatori provvisti di nulla osta di segretezza. Nella parte pubblica, invece, sono state fornite informazioni generali sui criteri essenziali per l'identificazione di eventi dannosi a seguito di un atto terroristico, sui si-

ti bersaglio, sugli aggressivi presumibilmente utilizzabili e sulle modalità patogenetiche di detti aggressivi.

Nel maggio del 2003, in linea con il Piano di Difesa, è stato approvato il nuovo Piano Sanitario per il biennio 2003-2005 in cui, nel paragrafo 4.8, si descrive la «Pianificazione e risposta sanitaria in caso di eventi terroristici ed emergenze di altra natura»<sup>67</sup>. In questo documento sono stati riconfermati tutti i punti riportati nel Piano Sanitario dell'anno precedente, come descritti nella relazione del Ministero della Salute sopra citata. Infine, il 26 maggio 2004 è stata emanata la Legge n. 138/2004 che ha convertito il DL 29 marzo 2004, n. 81, recante *Interventi urgenti per fronteggiare situazioni di pericolo per la salute pubblica [...] al fine di contrastare le emergenze legate prevalentemente alle malattie infettive e diffuse e al bioterrorismo*. In linea con il modello americano dei CDCs, è stato istituito e reso operativo il Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie infettive (CCM), con il compito di effettuare analisi e gestione di rischi, coordinamento con le Regioni e con altre realtà istituzionali e con analoghe realtà internazionali, promuovendo l'aggiornamento, la formazione e la diffusione delle informazioni nell'ambito dei diversi campi di interesse della salute pubblica, ivi compreso il bioterrorismo. La legge ha predisposto, inoltre, la riorganizzazione dei finanziamenti destinati alla Sanità Pubblica per fornire strumenti più idonei ad affrontare un eventuale attacco con armi biologiche<sup>68</sup>.

## Conclusioni

Nel presente lavoro è stato illustrato come si possa valutare il contributo della scienza nel fronteggiare il problema delle armi biologiche e del bioterrorismo a partire dal supporto necessario alla redazione della BTWC. Qui, il contributo delle scienze è molto generico, limitandosi a rappresentare la risposta a un soggetto che vuole conoscere un fenomeno da regolamentare, e pertanto non sembrerebbe giustificare di per sé l'esistenza di una disciplina autonoma. In tale contesto, infatti, il contributo scientifico è meramente descrittivo: la microbiologia è utile nella descrizione delle problematiche da affrontare ed eventualmente nella predisposizione di strumenti di controllo nella BTWC, così come la chimica ha contribuito alla redazione della CWC. In entrambi i casi si potrà porre un problema di linguaggio utilizzato nel descrivere un fenomeno a non specialisti, ma non di nuove questioni scientifiche, che richiedano un nuovo approccio metodologico. Ben diverso è il contributo della scienza alle indagini nel caso di un crimine. In questo caso l'apporto della scienza richiede un approccio metodologico nuovo. La spedizione di una serie di lettere contenenti spore del *Bacillus anthracis* nel 2001, pochi giorni dopo gli attentati alle Torri Gemelle di New York, ha costituito il pri-

mo attacco bioterroristico vero e proprio. L'attività microbiologica tradizionale ha consentito di individuare il patogeno responsabile del contagio in risposta all'emergenza sanitaria. A questo punto si è posto un nuovo problema, tipico per la criminalistica ma non per la microbiologia: cercare di risalire alla fonte del materiale utilizzato per commettere il crimine, determinando l'esatto sottotipo del ceppo batterico. Tale fase, detta dell'"identificazione", è parte del processo di formazione comune a tutte le prove scientifiche e si realizza attraverso il confronto fra una traccia di origine incerta e una di origine certa, nel tentativo di determinare se i due elementi del confronto abbiano la stessa origine.

In questi termini, la microbiologia forense affronta un nuovo problema scientifico, applicando i principi fondamentali e l'approccio operativo della criminalistica. I principi sono quello di Locard e quello della divisibilità della materia. L'approccio operativo è quello per fasi successive a partire dall'esame di una scena del crimine classificando e, in seguito, identificando elementi di prova, per tentare di associare un sospetto a un crimine e di ricostruirne la condotta. Nell'esempio illustrato non è stato ancora possibile identificare i responsabili dell'attacco bioterroristico e ricostruirne la condotta. Possiamo però già parlare di prima indagine di una disciplina nuova, denominata microbiologia forense. Non ci si è infatti limitati alla semplice caratterizzazione fenotipica del microrganismo responsabile del contagio ma è stata determinata l'esatta variante genomica, al fine di identificare le possibili fonti dell'agente biologico, nel tentativo di risalire ai gruppi terroristici che, verosimilmente, avrebbero potuto avere accesso a quelle fonti.

### Ringraziamenti

Gli Autori sono profondamente grati al prof. Fabio Altieri, del Dipartimento di Scienze Biochimiche Rossi-Fanelli, Università degli studi di Roma "La Sapienza", e al prof. Raffaele D'Amelio, dell'UOC Immunologia Clinica – Allergologia – Reumatologia dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", per i preziosi suggerimenti e chiarimenti che hanno permesso di completare lo studio.

### Bibliografia

- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP *et al.* Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1019-28.
- Riedel S. Anthrax: a continuing concern in the era of bioterrorism. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2005; 18: 234-243.
- Gronvall GK. A new role for scientists in the Biological Weapons Convention. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1213-16.
- Greene CM, Reefhuis J, Tan C *et al.* Epidemiologic investigations of bioterrorism-related anthrax, New Jersey, 2001. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1048-55.
- Butler JC, Cohen ML, Friedman CR, Scripp RM, Watz CG. Collaboration between public health and law enforcement: new paradigms and partnerships for bioterrorism planning and response. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1152-56.
- Kortepeter MG, Cieslak TJ, Eitzen EM. Bioterrorism. *J Environ Health* 2001; 63: 21-24.
- Budowle B, Schutzer SE, Ascher MS *et al.* Toward a system of microbial forensics: from sample collection to interpretation of evidence. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2209-13.
- McEwen SA, Wilson TM, Ashford DA, Heegaard ED, Kournikakis B. Microbial forensics for natural and intentional incidents of infectious disease involving animals. *Rev Sci Tech* 2006; 25: 329-339.
- Morse SA, Budowle B. Microbial forensics: application to bioterrorism preparedness and response. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 455-473.
- Budowle B, Harmon R. HIV legal precedent useful for microbial forensics. *Croat Med J* 2005; 46: 514-521.
- Budowle B, Johnson MD, Fraser CM, Leighton TJ, Murch RS, Chakraborty R. Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit Rev Microbiol* 2005; 31: 233-254.
- Koplan JP, Thacker SB. Fifty years of epidemiology at the Centers for Disease Control and Prevention: significant and consequential. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 982-984.
- Khan AS, Morse S, Lillibridge S. Public-health preparedness for biological terrorism in the USA. *Lancet* 2000; 356: 1179-82.
- Koplan J. CDC's strategic plan for bioterrorism preparedness and response. *Public Health Rep* 2001; 116 Suppl. 2: 9-16.
- Marston C. *Training the trainers: building bioterrorism response capacity to rapidly isolate and identify Bacillus anthracis*. Abstracts book of the 4<sup>th</sup> International Conference on Anthrax, Annapolis, MD, USA, 2001.
- ISO/IEC 17025. General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories. Disponibile sul sito internet [www.17025.homestead.com/index.html](http://www.17025.homestead.com/index.html) (ultimo accesso gennaio 2007).
- Rusnak JM, Kortepeter MG, Hawley RJ, Boudreau E, Aldis J, Pittman PR. Management guidelines for laboratory exposures to agents of bioterrorism. *J Occup Environ Med* 2004; 46: 791-800.
- Budowle B, Schutzer SE, Burans JP *et al.* Quality sample collection, handling, and preservation for an effective microbial forensics program. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6431-38.
- Varkey P, Poland GA, Cockerill FR 3<sup>rd</sup>, Smith TF, Hagen PT. Confronting bioterrorism: physicians on the front line. *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 661-672.
- Budowle B, Murch R, Chakraborty R. Microbial forensics: the next forensic challenge. *Int J Legal Med* 2005; 119: 317-330.
- Richmond JY, Nesby-O'Dell SL. Laboratory security and emergency response guidance for laboratories working with select agents. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2002; 51: 1-6.
- Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 583-607.
- Budowle B, Schutzer SE, Einseln A *et al.* Public health. Building microbial forensics as a response to bioterrorism. *Science* 2003; 301: 1852-53.
- Popovic T, Glass M. Laboratory aspects of bioterrorism-related anthrax. From identification to molecular subtyping to microbial forensics. *Croat Med J* 2003; 44: 336-341.
- Cebula TA, Brown EW, Jackson SA, Mammel MK, Mukherjee A, LeClerc JE. Molecular applications for identifying microbial pathogens in the post-9/11 era. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; 53: 431-445.
- Inman K, Rudin N. The origin of evidence. *Forensic Sci Int* 2002; 126: 11-16.
- Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 203-221.
- Strachan T, Read AP. *Genetica Umana Molecolare*. II ed. UTET, Torino, 2001.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 PT 1: 263-273.
- Schutzer SE, Budowle B, Atlas RM. Biocrimes, microbial forensics, and the physician. *PLoS Med* 2005; 2: 337.
- van Belkum A, Scherer S, van Alphen L, Verbrugh H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 275-293.
- Vogler AJ, Busch JD, Percy-Fine S, Tipton-Hunton C, Smith KL, Keim P. Molecular analysis of rifampin resistance in *Bacillus an-*

- thracis and *Bacillus cereus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 511-513.
33. Pearson T, Busch JD, Ravel J, Read TD, Rhoton SD, U'Ren JM, Simonson TS, Kachur SM, Leadem RR, Cardon ML, Van Ert MN, Huynh LY, Fraser CM, Keim P. Phylogenetic discovery bias in *Bacillus anthracis* using single-nucleotide polymorphisms from whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13536-41.
  34. Keim P, Van Ert MN, Pearson T, Vogler AJ, Huynh LY, Wagner DM. Anthrax molecular epidemiology and forensics: using the appropriate marker for different evolutionary scales. *Infect Genet Evol* 2004; 4: 205-213.
  35. Robertson B, Vignaux GA. DNA evidence: wrong answers or wrong questions? *Genetica* 1995; 96: 145-152.
  36. Aitken CGG, Taroni F. *Statistics and the Evaluation of Evidence for Forensic Scientists (Statistics in Practice)*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & Sons, Hoboken, 2004.
  37. Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, Popovic T. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1111-16.
  38. Pannucci J, Okinaka RT, Sabin R, Kuske CR. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacteriol* 2002; 184: 134-141.
  39. Pannucci J, Okinaka RT, Williams E, Sabin R, Ticknor LO, Kuske CR. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. *BMC Genomics* 2002; 3: 34.
  40. Ezzell JW, Welkos SL. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 250.
  41. Bhatnagar R, Batra S. Anthrax toxin. *Crit Rev Microbiol* 2001; 27: 167-200.
  42. Agrawal A, Pulendran B. Anthrax lethal toxin: a weapon of multi-system destruction. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2859-65.
  43. Andersen GL, Simchock JM, Wilson KH. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J Bacteriol* 1996; 178: 377-384.
  44. Keim P, Kalif A, Schupp J *et al.* Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 1997; 179: 818-824.
  45. Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 4407-14.
  46. Ticknor LO, Kolsto AB, Hill KK *et al.* Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4863-73.
  47. Brey RN. Molecular basis for improved anthrax vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 1266-92.
  48. Price LB, Hugh-Jones M, Jackson PJ, Keim P. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1999; 181: 2358-62.
  49. Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, Worsham PL, Wong J, Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3179-85.
  50. Pourcel C, Andre-Mazeaud F, Neubauer H, Ramisse F, Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol* 2004; 4: 22.
  51. Vergnaud G. *Yersinia pestis* genotyping. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1317-18; *author reply* 1318-19.
  52. Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3186-92.
  53. Johansson A, Farlow J, Larsson P *et al.* Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J Bacteriol* 2004; 186: 5808-18.
  54. Keim P, Price LB, Klevytska AM *et al.* Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 2000; 182: 2928-36.
  55. Le Flèche P, Hauck Y, Onteniente L *et al.* A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol* 2001; 1: 2.
  56. Lista F, Faggioni G, Valjevac S *et al.* Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. *BMC Microbiol* 2006; 6: 33.
  57. Stratilo CW, Lewis CT, Bryden L, Mulvey MR, Bader D. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 777-782.
  58. Diamant E, Palti Y, Gur-Arie R, Cohen H, Haller EM, Kashi Y. Phylogeny and strain typing of *Escherichia coli*, inferred from mononucleotide repeat loci. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2464-73.
  59. Gur-Arie R, Cohen C.J, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM, Kashi Y. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition and polymorphism. *Genome Res* 2000; 10: 62-71.
  60. Read TD, Salzberg SL, Pop M, Shumway M, Umayam L, Jiang L, Holtzapple E, Busch JD, Smith KL, Schupp JM, Solomon D, Keim P, Fraser CM. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 2002; 296: 2028-33.
  61. Carattoli A, Ciervo A, Pozzi G, Oggioni M. Applicazioni di biologia molecolare nella diagnostica di *Bacillus Anthracis* e altri batteri. *Bioterrorismo: come prepararsi e quali contromisure intraprendere. Notiziario dell'ISS* 2002; (15) 6.
  62. Ecker DJ, Sampath R, Willett P *et al.* The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiol* 2005; 5: 19.
  63. Ecker DJ, Sampath R, Willett P *et al.* The Microbial Rosetta Stone database: a common structure for microbial biosecurity threat agents. *J Forensic Sci* 2005; 50: 1380-85.
  64. Ministero della Salute. *Relazione sullo stato sanitario del Paese 2001-2002*. Disponibile sul sito internet [www.ministerosalute.it](http://www.ministerosalute.it) (ultimo accesso gennaio 2007).
  65. Fasanella A. *Antrace: esperienza del Centro di Riferimento Nazionale. Bioterrorismo: come prepararsi e quali contromisure intraprendere. Notiziario dell'ISS* 2005; (15) 6.
  66. Fasanella A, Van Ert M, Altamura SA *et al.* Molecular diversity of *Bacillus anthracis* in Italy. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3398-3401.
  67. Decreto del Presidente della Repubblica 23 maggio 2003. *Approvazione del Piano sanitario nazionale 2003-2005*.
  68. Legge 26 maggio 2004, n. 138. *Interventi urgenti per fronteggiare situazioni di pericolo per la salute pubblica*.

## ABSTRACT

The letters containing anthrax, sent in 2001 in USA, showed that pathogens and toxins can be effectively used for terrorist purposes. A new subfield of forensic science, called "microbial forensics", has been developed. It is a new scientific discipline dedicated to collect and analyze microbiological evidence from a scene of crime. In addition to collecting and analyzing traditional forensic evidences, the microbial forensic investigation will attempt to determine the identity of the causal agent, as so as epidemiologic investigation, but with higher-resolution characterization. The tools for a successful attribution include genetically based-assays to determine the exact strain of isolate, aiming

the individualization of the source of the pathogen used in a biological weapon. Following the 2001 anthrax attacks, genotyping of *B. anthracis* was done on 8 variable number tandem repeats loci (VNTR polymorphisms), with multilocus variable number tandem repeats (MLVA) method. In recent years some research groups have increased the VNTR markers number to 25 loci, while other groups have identified single nucleotide repeat (SNR) polymorphisms, which display very high mutation rates. SNR marker system allows the distinguishing of isolates with extremely low levels of genetic diversity within the same MLVA genotype.