
003

DIFFERENZIAMENTO DI SPECIE IN MYC. TUBERCULOSIS COMPLEX MEDIANTE PCR-RFLP

Paglia M.G.*, De Mori P., Festa A., Nebuloso E.*, Pucillo L.P., Visca P.*

Laboratorio di analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia
* Unità di Microbiologia Molecolare, I.N.M.I. L. Spallanzani, IRCCS, Roma.

I membri del *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) sono causa di tubercolosi nell'uomo e negli animali. Essi sono caratterizzati da un elevato grado di identità genetica (99.9% di similarità a livello nucleotidico).

Questo non consente di utilizzare gli RNA ribosomali (rRNA) o le sequenze spaziatriche interne 16S-23S rRNA (ITS) per l'allocatione tassonomica a livello di specie.

A riguardo, sono stati sviluppati sistemi molecolari alternativi per differenziare le specie appartenenti al complesso MTC: uno dei più recenti è costituito dal gene *gyrB* (subunità B della DNA girasi topoisomerasi II) di *Mycobacterium* spp (Kasai et al., JCM, 38:301-308), caratterizzato da una elevata variabilità della sequenza nucleotidica.

Scopo del nostro studio è stato quello di valutare il potere discriminatorio di detto gene per differenziare le specie appartenenti al complesso MTC.

Materiali e metodi.

Sono stati utilizzati 25 ceppi di MTC isolati nel periodo gennaio-aprile 2005. I ceppi di riferimento *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG sono stati impiegati per la messa a punto della PCR-RFLP. Il DNA dei ceppi è stato estratto con QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), previa digestione con lisozima e proteinasi K. Un tratto (1.020 bp) del gene *gyrB* è stato amplificato con i primers MTUB-f/MTUB-r. I prodotti

di PCR sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione *RsaI*, *TaqI* e *SacII*.

Risultati e Conclusioni.

Dopo digestione enzimatica i ceppi di riferimento hanno mostrato i seguenti profili di restrizione:

<i>RsaI</i>	<i>TaqI</i>	<i>SacII</i>	N. ceppi	Specie/ Riferimento
555- 375	450-270- 130-100- 80	indigerito	26	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
470- 375	450-160- 130-105- 100-80	indigerito	1	<i>M. bovis</i> BCG

Tutti gli isolati clinici identificati fenotipicamente come *M. tuberculosis* complex avevano profili identici a quello ottenuto per *M. tuberculosis* H37Rv e perciò possono essere inclusi nella specie *M. tuberculosis*. In base alla nostra esperienza la PCR-RFLP è una metodica di semplice esecuzione, rapida e a basso costo, ed è attendibile per l'attribuzione di specie tra i membri del complesso MTC.