

sierotipo poco comune, il sierotipo 24F, responsabile di casi di meningite a Napoli.

S2.6

LA TIPIZZAZIONE MOLECOLARE NELLE INFEZIONI DA MICOBATTERI TUBERCOLARI

Cirillo D.M.

SC Microbiologia, AO San Giovanni Battista - Torino

La tubercolosi costituisce un importante problema di salute pubblica in tutto il mondo, non solo nei paesi in via di sviluppo ove i tassi di incidenza sono epidemici, ma anche nei paesi industrializzati, soprattutto in popolazioni a rischio come i soggetti immunocompromessi e gli immigrati. L'epidemiologia molecolare rappresenta un nuovo ed irrinunciabile strumento nella lotta alla malattia tubercolare. La genotipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis* permette di delinearne il percorso interumano con importanti ricadute in termini di sorveglianza della dinamica diffusiva della malattia. Dal punto di vista metodologico l'analisi dei polimorfismi di restrizione della sequenza IS6110 (RFLP-IS6110) rappresenta la metodica di riferimento per la tipizzazione degli isolati di *M. tuberculosis*. Tale tecnica, per la sua complessità permette un'analisi dei dati con mesi di ritardo dalla raccolta del campione. Tecnica alternativa per quei ceppi con poche sequenze inserzionali IS6110 è l'elettroforesi in campo pulsato dopo digestione del genoma con enzimi di restrizione. Anch'essa richiede la crescita di micobatteri tubercolari in alte quantità. Pertanto uno degli orientamenti attuali è rappresentato dalla valutazione di metodiche in amplificazione, più rapide ed applicabili anche a minime quantità di DNA. A tale scopo sono state proposte tecniche che utilizzano come target le sequenze inserzionali IS6110 (LM-PCR, mixed-linker PCR) o sequenze differenti (spoligotyping). Il potere discriminatorio di tali metodiche si è rivelato però inferiore all'RFLP-IS6110, che resta a tutt'oggi il "gold standard" per la genotipizzazione di *M. tuberculosis*. La Haeminested Inverse PCR (HIP), basata sulla amplificazione di sequenze che fiancheggiano l'IS6110 e la VNTR-MIRU che si basa sui variable number tandem repeats (VNTR) di elementi definiti mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU) si sono dimostrate promettenti sia per il potere discriminatorio sia per la semplicità di esecuzione. Un secondo aspetto applicativo delle metodiche di genotipizzazione rapida potrebbe essere rappresentato dalla possibilità di operare direttamente sul campione clinico, fornendo in tempo pressoché reale notizie importanti dal punto di vista clinico ed epidemiologico. Sino ad ora esistono studi in letteratura riguardanti solamente lo spoligoty-

ping, che presenta però il limite di essere una metodica relativamente poco discriminante e quindi di limitata utilità. Sicuramente la messa a punto e la validazione di protocolli operativi riguardanti in questo ambito altre metodiche rapide potrebbe rappresentare un netto salto di qualità metodologico degli studi di epidemiologia.

S2.7

TIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI BACILLUS ANTHRACIS

Carattoli A.¹, Oggioni M.R.²

¹ *Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Istituto Superiore di Sanità-Roma;*

² *Laboratorio di Microbiologia Molecolare e Biotecnologia, Dipartimento di Biologia Molecolare, Università di Siena - Siena*

In accordo con le linee guida internazionali (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) e nazionali (Istituto Superiore di Sanità, ISS), la diagnosi microbiologica di *Bacillus anthracis* è organizzata in livelli progressivi di accertamento e conferma. Nel caso di sospetto isolamento di *B. anthracis*, il ceppo viene analizzato per la conferma definitiva da un laboratorio di riferimento nazionale. Durante l'attacco bioterroristico negli USA, in Italia sono state elaborate linee guida per il potenziamento diagnostico di agenti patogeni potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico ed è stata creata una rete di laboratori di riferimento in grado di fornire una diagnosi definitiva ed eventualmente una tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. In questo ambito, il gruppo di lavoro sul bioterrorismo ISS in collaborazione con l'Università di Siena ha messo a punto metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR ed ibridazione con sonde specifiche (Real-time PCR) per il riconoscimento e la caratterizzazione di *B. anthracis*. In particolare, è stato messo a punto un protocollo diagnostico basato sulla rilevazione diretta di spore di *B. anthracis* nei tamponi nasali, mediante arricchimento in brodo, sterilizzazione in autoclave e rilevazione di geni specifici per Real-time PCR. Sono state disegnate due coppie di primer utili all'identificazione definitiva di *B. anthracis*: una sul gene *lef* del plasmide pX01 ed una sul gene cromosomale *rpoB*. Inoltre, una sonda disegnata sul gene *lef* (*lefC* probe) permette di distinguere il ceppo Sterne (ceppo vaccinale veterinario), usato nel nostro protocollo come controllo positivo dai ceppi selvatici isolati in Italia e dal ceppo Florida isolato negli USA dal primo caso di antrace polmonare nel 2001. La sonda disegnata sul gene *rpoB* distingue il *B. anthracis* da altre specie del genere *Bacillus*, compreso il *B. cereus*. Per la tipizzazione dei ceppi di *B. anthracis* sono state messe a punto tecniche di amplificazione e sequenzia-

mento del DNA per la rilevazione di loci polimorfici nei geni *vrrA* e *vrrB*. Mediante questa analisi sono state individuate le varianti genetiche che caratterizzano alcuni ceppi isolati in Italia dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali delle Venezie e del Lazio e Toscana da animali e dall'uomo. Questo tipo di analisi è riconosciuta a livello internazionale ed è utilizzabile in caso di attacco bioterroristico come indagine per la ricerca della sorgente di infezione e per la comparazione di ceppi isolati dai casi clinici e dall'ambiente.