Zeitschrift: Bollettino della Società ticinese di scienze naturali
Herausgeber: Società ticinese di scienze naturali
Band: 85 (1997)

Artikel: Impiego della biologia molecolare in batteriologia
Autor: Martinetti-Lucchini, Gladys
DOI: https://doi.org/10.5169/seals-1003302

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 05.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Impiego della biologia molecolare in batteriologia

Gladys Martinetti-Lucchini

Bauherrenstrasse 40, 8049 Zurigo

La commissione del fondo nazionale svizzero per la ricerca scientifica del Politecnico federale di Zurigo ha parzialmente finanziato il mio soggiorno di due anni e mezzo come postdoc negli Stati Uniti presso il laboratorio di J. Loper all'Horticultural Crops Research Laboratory, Corvallis OR, e il laboratorio di G. Nester al Department of Microbiology, School of Medicine, University of Washington, Seattle. Il finanziamento del fondo nazionale della durata di un anno mi ha permesso di scegliere un laboratorio che corrispondesse alle mie esigenze in campo scientifico ed ha sicuramente costituito una base per il finanziamento da parte delle istanze americane della seconda parte del mio postdoc. Durante questo periodo ho avuto l'opportunità di apprendere le tecniche molecolari che ho potuto applicare nel campo della microbiologia medica al mio ritorno a Zurigo presso l'Istituto di microbiologia medica dell'Università dove ho lavorato per un periodo di 5 anni e presso un laboratorio privato di diagnostica molecolare.

INTRODUZIONE

Le tecniche molecolari sono state introdotte nel campo della microbiologia medica solo nel corso dell'ultimo decennio e hanno avuto un'applicazione soprattutto nell'analisi di popolazioni batteriche per la sistematica e l'epidemiologia nonché nello sviluppo di un'investigazione molecolare che permette di dimostrare la presenza di agenti patogeni (virus, batteri, parassiti) nel materiale clinico.

I miei progetti hanno riguardato soprattutto la ricerca epidemiologica e la diagnostica molecolare.

La ricerca epidemiologica

La ricerca epidemiologica con tecniche di biologia molecolare si basa soprattutto sull'analisi di profili molecolari (DNA fingerprinting). Durante le mie ricerche mi sono occupata di un tipo specifico di DNA fingerprinting denominato ribotyping. Desidero brevemente illustrarne il procedimento. Dopo aver isolato i ceppi coinvolti in un'epidemia così come pure i ceppi estranei provenienti da collezioni come controlli negativi si isola il DNA e lo si taglia con l'ausilio di endonucleasi che riconoscono una sequenza specifica di nucleotidi. I frammenti ottenuti vengono separati a seconda della loro lunghezza in un gel di agarosio per mezzo di un'elettroforesi e visualizzati dopo una colorazione specifica. Il DNA viene poi denaturato, trasferito e fissato su una membrana ed in seguito ibridato con una sonda specifica marcata in modo radioattivo o con molecole non radioattive. I profili ottenuti permettono di effettuare un confronto diretto fra ceppi batterici apparentemente identici. La sonda utilizzata per il ribotyping rappresenta un frammento di DNA del batterio *Escherichia coli* che codifica per il 16S RNA ribosomale. Questi geni sono particolarmente conservati e la stessa sonda può perciò essere utilizzata per analizzare molte specie batteriche. Queste ricerche sono particolarmente utili per elucidare fonti e interazioni tra ceppi coinvolti in epidemie. Abbiamo effettuato ricerche con *Salmonella enteritidis* (coinvolto in diarree dell'uomo), *Aeromonas sp.* (germe a diffusione acquatica coinvolto in diarree), *Campylobacter* jejuni (coinvolti in diarree), *Corynebacterium diphtheriae*. Ceppi di questo batterio sono stati isolati ripetutamente da pazienti tossicodipendenti che frequentavano l'ambiente della droga di Zurigo. Questi ceppi pur non producendo la tossina (vedi sotto) furono in grado di causare infezioni serie. Abbiamo potuto dimostrare che questi ceppi erano identici e si differenziavano in modo molto chiaro da altri ceppi dello stesso batterio isolati nello stesso periodo in altre città svizzere (Berna, Ginevra) o da ceppi provenienti da collezioni. Queso tipo di analisi può essere usato anche per determinare cause di epidemie che riguardano problemi di igiene ospedaliera.

La diagnostica molecolare

Nel corso degli anni si è potuto riscontrare una certa insoddisfazione da parte dei microbiologi nei confronti dei metodi diagnostici cosiddetti classici cioè basati sulla coltura dell'organismo. Questa insoddisfazione deriva dal fatto che alcuni organismi presentano caratteristiche non adatte alla coltura su terreno artificiale (Tab. 1). I metodi molecolari, di cui i più noti sono la **PCR** (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) e la **LCR** (**L**igase **C**hain **R**eaction) si basano sull'amplificazione di un preciso frammento di DNA e permettono almeno teoricamente di identificare anche una sola molecola presente in un materiale clinico, aumentando così notevolmente la sensitività del test.

Il problema delle contaminazioni

Parallelamente quest'enorme sentitività costituisce anche uno svantaggio per quanto riguarda l'eventuale presenza

Bollettino della Società ticinese di Scienze naturali - 85, 1997, pp. 109-111 (ISSN 0379-1254)

di contaminazioni che porterebbero ad un risultato falsamente positivo. Il controllo puntuale delle tecniche di laboratorio con separazione delle diverse fasi (preparazione del DNA, inoculazione della reazione, analisi dei risultati) in locali indipendenti, così come l'impiego dell'enzima Uracil-N-Glycosylase) dovrebbero ridurre notevolmente il pericolo di contaminazioni.

Le contaminazioni cosiddette «biologiche» (batteri patogeni presenti sulla pelle o sulle mucose senza però provocare nessun sintomo) possono provocare difficoltà nell'interpretazione di un risultato positivo. A causa del loro numero ridotto non verrebbero identificati con metodi meno sensibili, o verrebbero considerati come colonizzatori insignificanti nell'analisi semiquantitativa di una coltura su terreno artificiale.

Identificazione dei organismi difficili da coltivare

Questi metodi molecolari trovano una loro applicazione soprattutto dove i metodi classici forniscono risultati insoddisfacenti. A mo' di esempio si potrebbe citare il Genere *Bartonella*, le cui speci *Bartonella henselae* e *Bartonella quintana* (responsabili rispettivamente della cat scrach disease e della bacillary angiomatosis) non sono coltivabili in laboratorio anche partendo da prove cliniche giudicate positive con la PCR. Tra gli agenti responsabili di infezioni alle vie respiratorie *Mycobacterium tuberculosis* (responsabile della tuberculosi), *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* sono adatti a queso tipo di identificazione a causa della durata della coltura (*M. tuberculosis*) o della complessità dei terreni (*M. pneumoniae*).

Identificazione di fattori di virulenza

In alcuni organismi coltivabili facilmente un'analisi molecolare non avrebbe nessun senso se non permettesse di identificare dei fattori di patogenicità o di invasività presenti in alcune varietà della stessa specie non distinguibili morfologicamente. Questa caratteristica viene particolarmente riscontrata nel batterio *Escherichia coli* i cui rappresentanti apatogeni costituiscono la parte preponderante della nostra flora intestinale. Alcuni ceppi sono però in grado di produrre tossine che aumentano notevolmente la loro patogenicità causando forti diarree e complicazioni cliniche anche molto rilevanti. A questo proposito si ricordi ad esempio la recente epidemia in Giappone causata da *E. coli* O157:H7. A seconda dell'anamnesi del paziente si giustifica perciò un'analisi di questo tipo. Utilizzando la PCR abbiamo potuto aumentare la percentuale delle identificazioni dell'agente patogeno dal 26 a più del 50% nel caso di pazienti sintomatici di ritorno da un viaggio mentre i campioni isolati da pazienti asintomatici risultarono negativi.

Il batterio *Corynebacterium diphtheriae*, agente della difterite può produrre una tossina identificabile in poco tempo con la PCR senza dover ricorrere all'inoculazione del porcellino d'India, procedura laboriosa e lenta. I ceppi di questo batterio, isolati nell'area zurighese da persone tossicodipendenti si rivelarono negativi per quanto riguarda la produzione della tossina.

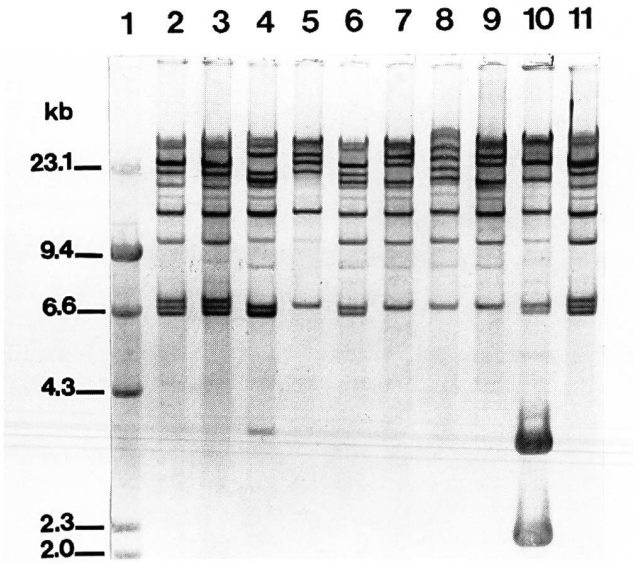

Fig. 1. Profili ribosomali di DNA provenienti da ceppi di *Salmonella enteritidis*. Si noti la diversità dei profili ma l'identità dei profili 2, 3, 11. Il profilo 1 rappresenta DNA dal fago lamda digerito con l'enzima *Hind*III e viene usato come marker.

CONCLUSIONI

Questo tipo di analisi può essere effettuato per l'identificazione di innumerevoli agenti patogeni, che a causa della mancanza di spazio mi è impossibile elencare in dettaglio. Le industrie produttrici di test per la diagnostica hanno lanciato sul mercato alcuni kits per l'identificazione di batteri o virus importanti economicamente. Nella maggior parte dei casi l'analisi molecolare viene effettuata nel laboratorio seguendo sistemi sviluppati nel laboratorio stesso o adattati da metodi già pubblicati. Sia i cosiddetti «home made» test che quelli reperibili commercialmente richiedono però personale specializzato e devono essere valutati prima del loro impiego nella diagnostica di routine.

Problemi legati alle colture batteriche

- Batteri non coltivabili o difficilmente coltivabili *(Mycobacterium leprae, Trophyrema whippelii, Bartonella henselae, quintana)*.
- La coltura è influenzata da una precedente terapia antibiotica.
- La velocità di crescita è molto lenta (*Mycobacterium tuberculosis*).
- La coltura richiede terreni troppo elaborati per la diagnostica di routine *(Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Chlamydia trachomatis)*.
- Gli organismi muoiono facilmente durante il trasporto *(Neisseria gonorrhoeae, Chlamydia trachomatis)*.
- La coltura non ha nessun significato poiché nella stessa specie si conoscono sia ceppi patogeni che non patogeni (*Corynebacterium diphtheriae, Escherichia coli* enterovirulenti.

Tab. 1

BIBLIOGRAFIA

ALTWEGG M., ALTWEGG-BISSIG R., DEMARTA A., PEDUZZI R., REEVES M.W. and SWAMINATHAN B. Comparison of four typing methods for *Aeromonas* species. J. Diarrhoeal Dis. Res. 6: 88-94 (1988).

MARTINETTI G., and ALTWEGG M. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as atool for typing *Salmonella enteritidis*. Res. Microbiol. 141: 1151-1162 (1990).

ALTWEGG M., MARTINETTI LUCCHINI G., LÜTHY-HOTTENSTEIN J., and ROHRBACH M. Aeromonas-associated gastroenteritids after consumption of contaminated shrimp. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10: 44-45 (1991).

MOYER N.P., MARTINETTI LUCCHINI G., HOLCOMB L.A., HALL N.H. and ALTWEGG M. Application of ribotyping for differentiating Aeromonads isolated from clinical and environmental sources. Appl. Environm. Microbiol. 58: 1940-1944 (1992).

GRUNER E., ZUBER P.L.F., MARTINETTI LUCCHINI G., von GRAEVENITZ A., and ALTWEGG M. A cluster of non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* infections among Swiss interavenous drug abusers. Med. Microbiol. Lett. 1: 160-167 (1992).

MARTINETTI LUCCHINI G., GRUNER E., and ALTWEGG M. rapid detection of diphtheria toxin by the Polymerase Chain Reaction. Med. Microbiol. Lett. 1: 276-283 (1992).

ZBINDEN R., GOLDENBERGER D., MARTINETTI LUCCHINI G., and ALTWEGG M. Comparison of two methods for detectiong intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of lyme neuroborreliosis. J. Clin. Microbiol. 32: 1795-1798 (1994).

MARTINETTI LUCCHINI G., and ALTWEGG M. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by polymerase chain reaction. In: Methods in DNA amplification. Plenum Publishing Company Ltd. London 1994.