

Single-Step PCR e Sequenziamento della regione ipervariabile dell' ITS 16S/23S rRNA per la Diagnosi molecolare di *Bartonella*

M. C. Liberto, A. Quirino, C. Muzzupappa*, C. Mammi*,
R. Capicotto, L. A. Rametti, C. Laganà*, A. Focà.

Dipartimento di Scienze Mediche, Cattedra di Microbiologia, Università "Magna Graecia", Catanzaro
*U.O. Genetica Medica, Azienda Ospedaliera BMM, Reggio Calabria.

Riassunto. In questo studio abbiamo applicato la metodica "single-step PCR" su un ceppo di riferimento, su un isolato clinico di *Bartonella quintana* ed uno di *Bartonella henselae*.

La metodica "single-step PCR" consente di fare, al contempo, diagnosi di genere e di specie con una sola reazione di PCR, usando una singola coppia di primers. Per la sua esecuzione è stata apportata una modifica quale l'utilizzo di un sequenziatore automatico che permette un'elettroforesi capillare in fluorescenza. Abbiamo inoltre eseguito il sequenziamento della regione ipervariabile dell'ITS 16S/23S rRNA di *Bartonella quintana* che ci ha permesso di genotipizzare l'isolato clinico.

Abstract. The "single -step PCR" assay was applied to analyze one reference strain, one clinical strain of *Bartonella quintana* and one clinical strain of *Bartonella henselae*. The "single -step PCR" assay allows to detect and differentiate *Bartonella* species using a single PCR primer pairs. We modified the analysis of PCR products using the ABI 310 Genetic Analyzer capillary electrophoresis system. Moreover we carried out the partial sequence of ITS 16S/23S rRNA of *Bartonella quintana* for genotyping clinical strain.

Introduzione

Il genere *Bartonella*, precedentemente conosciuto come *Rochalimaea*, comprende una famiglia di batteri di piccole dimensioni, gram negativi, aerobi, ossidasi negativi. Caratteristiche comuni di questi microrganismi sono la trasmissione ad opera di ectoparassiti, solitamente vettori artropodi, e la capacità di sopravvivenza e replicazione all'interno di determinate cellule ospiti (1,15).

Sono state identificate sino ad oggi 14 specie, di cui almeno 7 sono considerate responsabili di malattie nell'uomo. *Bartonella quintana* (*B. quintana*), e *Bartonella henselae* (*B. henselae*) risultano essere i principali agenti infettivi responsabili, rispettiva-

mente, della febbre da trincea e della malattia da graffio del gatto: esse sono coinvolte anche in alcune forme di endocardite, nell'angiomatosi bacillare e nella peliosi epatica in pazienti immunocompromessi (1,9,14,15).

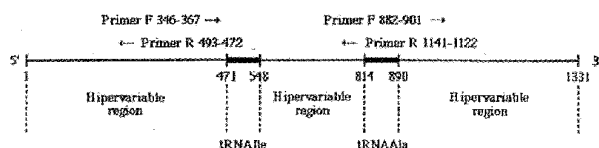
L'interesse suscitato da tali batteri è rappresentato principalmente dalla loro particolarità biologica e patogenetica che li rende capace in vivo ed in vitro di indurre effetti angiogenici a carico dell'endotelio vascolare (5, 6,7,12,13).

Le metodiche di laboratorio tradizionali per il riconoscimento di *Bartonella* presentano difficoltà diagnostiche oggettive. Per tale motivo, è emersa l'esigenza di mettere a punto tecniche di biologia molecolare da affiancare alle metodologie tradizionali.

La differenziazione di specie di *Bartonella* mediante PCR con l'utilizzo di molti primers si è rivelata inadeguata perché genere-specifica. Per l'applicazione diagnostica sono state prese in esame regioni geniche riferite a sequenze palindromiche, relative a geni codificanti per enzimi, per fattori di divisione cellulare e per la subunità ribosomiale 16S (2, 3, 4, 11, 16)

Recentemente, l'interesse si è spostato su l'Intergenic Spacer Region (ITS) 16S/23S rRNA, una regione compresa tra le sequenze codificanti le due subunità ribosomiali (8,17). Tale regione presenta un grado di polimorfismo sufficiente ad effettuare una differenziazione di specie e nel contempo possiede sequenze altamente conservate, tra le diverse specie, che garantiscono specificità per una eventuale applicazione diagnostica. Rispetto alla sequenza codificante per l'operone 16S rRNA, l'ITS 16S/23S rRNA di *Bartonella* spp. presenta variazioni sia nell'estensione totale della regione, ovvero nel *sizing*, sia nella sequenza nucleotidica (Fig.1)

Figura1. Diagramma schematico dell'ITS relativo a *Bartonella quintana*, strain Fuller. L'estremità 5' è confinante con la regione contenente l'operone 16S rRNA; sono presenti 3 regioni ipervariabili e 2 regioni altamente conservate codificanti gli RNA di trasporto per gli aminoacidi isoleucina e alanina. L'estremità 3' rappresenta il confine con la regione contenente l'operone 23S rRNA. In alto sono evidenziate le regioni individuate dalle due diverse coppie di primers utilizzate per la diagnosi di specie e per la genotipizzazione su sequenza. Da Houpiqian, P., Raoult, D. 2001 J. Clin. Microbiol.

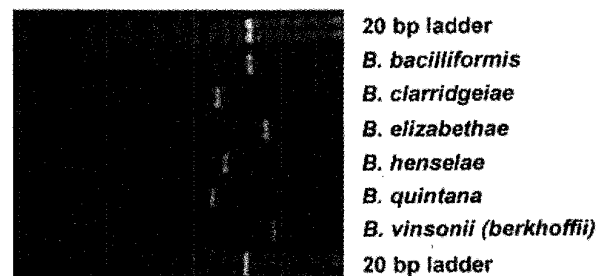


La caratteristica che riguarda le variazioni nel *sizing* di tale regione è stata sfruttata nella metodica single-step PCR che possiede dei vantaggi per le possibili applicazioni diagnostiche (10). Dopo amplificazione di un frammento della regione ITS 16S/23S rRNA con primers complementari alle sequenze conservate in tutte le specie di *Bartonella* considerate e successiva elettroforesi su gel dei prodotti di PCR, è possibile una identificazione a livello di specie senza ulteriore processamento del campione, basandosi sulla grandezza "unica" dell'amplificato (Fig.2).

Inoltre il sequenziamento della regione ITS 16S/23S rRNA ha messo in evidenza che, oltre a fare diagnosi di specie, tale regione è utile per eseguire una genotipizzazione del ceppo per la presenza di una porzione genomica caratterizzata da un'ampia variabilità nucleotidica intra-specie. In particolare è stato dimostrato (8) che in *B. henselae*, *B. bacilliformis*

e *B. clarridgeiae* la porzione ipervariabile è diversa per estensione nelle tre specie, con una variabilità limitata nei ceppi di una determinata specie, e soprattutto risulta unica per sequenza in ogni ceppo testato.

Figura 2. Elettroforesi su gel d'agarosio dei prodotti di PCR ottenuti dalle amplificazioni delle regioni dell'ITS 16S/23S rRNA di *Bartonella*. Da Jensen W.A. et al. 2000, J.Clin.Microbiol.



In *B. quintana*, invece, tale regione ha sempre una lunghezza costante, pari a 1331 bp, e le differenze di sequenza identificate nei ceppi studiati consistono in 4 sostituzioni di basi alle posizioni 860 nt, 940 nt, 959 nt e 1004 nt. Tali variazioni nucleotidiche sono comprese in una regione ristretta di 260 paia di basi, i nucleotidi rinvenuti sono comuni a più ceppi e le differenze esistenti hanno permesso di classificare i ceppi di *B. quintana* in 3 gruppi di genotipizzazione.

Alla luce di tali conoscenze abbiamo applicato la metodica "single-step PCR", utilizzando un ceppo di riferimento, un isolato clinico di *B. quintana* ed uno di *B. henselae*, apportando una modifica quale l'utilizzo di un sequenziatore automatico che permette un'elettroforesi capillare in fluorescenza. Inoltre il sequenziamento della regione ipervariabile dell'ITS 16S/23S rRNA di *B. quintana* ci ha permesso di genotipizzare l'isolato clinico.

Materiali e metodi

Ceppi batterici. Il ceppo di riferimento *B. quintana* Oklahoma, originariamente proveniente dall'Unité des Rickettsies, Faculté de Médecine, Centre National de la Recherche Scientifique de Marseille (Francia), era mantenuto in coltura su agar-sangue montone a 37°C in 5% CO₂. Il DNA di tale ceppo è stato estratto dopo 5-7 giorni di coltura.

I due isolati clinici "low passage", JK14 e JK9R; il primo di *B. quintana*, ottenuto da una lesione cutanea di un paziente affetto da HIV, ed il secondo di *B. henselae*, isolato dal sangue di un paziente HIV-positivo affetto da angiomatosi bacillare, sono stati forniti dalla Dr.ssa J.E. Koehler (Division of Infectious

Diseases, University of California, San Francisco, CA, USA)

I ceppi sono stati risospesi in Medium M199S, addizionato con sali di Earle's, 20% di siero fetale bovino, glutammica (2,7 mM), e sodio piruvato (1 mM) e coltivati in agar-sangue montone a 37°C, 5% CO₂. Il DNA è stato estratto dopo 5-7 giorni di coltura.

Estrazione del DNA. Il DNA per l'amplificazione è stato preparato dalle colture pure di ogni ceppo batterico utilizzando quale metodo di estrazione quello del "salting out" in assenza di cloroformio-fenolo, con precipitazione del DNA in isopropanolo.

In particolare è stato usato il kit Bdtract™ GENOMIC DNA ISOLATION KIT, prodotto da Maxim Biotech, Inc., San Francisco, CA, USA.

Single step PCR. La reazione di PCR è stata realizzata su un volume finale di 50 µl, in presenza di un tampone di reazione 10x standard alla concentrazione finale di MgCl₂ pari a 1,5 mM, una concentrazione finale di dNTPs pari a 200 µl, una concentrazione pari a 20 picomoli/µlitro di ciascun primer, 1 unità di Taq polimerasi.

I primers comuni utilizzati secondo i dati di letteratura (10) sono stati i seguenti:

PF: 5'-CTCTTTCTTCAGATGATGATCC-3'

PR: 3'-AACCAACTGAGCTACAAGCCCT-5'

Il primer forward è stato sintetizzato da Applera con una coniugazione accessoria all'estremità 5' di 6-carbossifluoresceina (6-FAM) con una lunghezza d'onda (λ) max di emissione pari a 517 nm e λ max di eccitazione pari a 494 nm. Tale coniugazione è fondamentale per la lettura del prodotto di PCR in elettroforesi capillare in fluorescenza. Alla Master Mix di reazione sono stati aggiunti 15 µl della diluizione finale in 100 µl del DNA estratto. La reazione di amplificazione è stata realizzata su un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystem) usando il seguente protocollo: 10' di incubazione a 20°C, seguiti da 2' di denaturazione a 95°C; seguono tre step ripetuti per 45 cicli: 1' di denaturazione a 95°C, 1' di annealing a 60°C, 30" di estensione a 72°C, seguiti da un'estensione finale di 10' a 72°C. La temperatura di annealing dei primers è stata scelta dopo una prova sperimentale eseguita su gradiente (60°, 58,7°, 57,1°, 56°).

Condizioni di elettroforesi. Il prodotto di PCR è stato visualizzato sia mediante transilluminazione UV di un gel d'agarosio (Nusieve GTG Agarose al 3%) colorato con bromuro di etidio dopo elettroforesi a 100 volt per 30' in presenza di uno standard di pesi molecolari (ladder a 123 bp e successivamente a 50 bp) sia su sequenziatore automatico del DNA ABIPRISM 310 (Perkin Elmer) dopo elettroforesi capillare a 16000 volt per 30' su polimero POP 4 (Applied Biosystem), e letto mediante rive-

latore fluorescente in presenza di uno standard di pesi molecolari coniugato TAMRA (λ max di emissione 583 nanometri, λ max di eccitazione 560 nanometri).

Il dato grezzo di analisi è stato elaborato dal software GeneScan 3.1 (Applied Biosystem) per il calcolo del peso molecolare mediante il metodo del Local Southern. Il dato è stato inoltre processato dal software Genotyper 2.5 (Applied Biosystem) per il calcolo dell'area sottostante il picco relativo allo specifico amplicone

Amplificazione e sequenziamento della regione ipervariabile dell' ITS 16S/23S rRNA per la genotipizzazione di *B. quintana*. La reazione di PCR è stata realizzata su un volume finale di 50 µl, in presenza di un tampone di reazione 10x standard alla concentrazione finale di MgCl₂ pari a 1,5 µM, una concentrazione finale di dNTPs pari a 200 µM, una concentrazione pari a 20 picomoli/µlitro di ciascun primer, 1 unità di Taq polimerasi. Sono stati utilizzati i primers denominati BQF (forward) e BQR (reverse) (8). Il primer forward è stato sintetizzato da Applera rispettando la sequenza

5'-CTCCACCATTTAGGTCATC-3';

il primer reverse rispetta la sequenza **3'-GGTTTTGAGAATTCCTTGC-5'.**

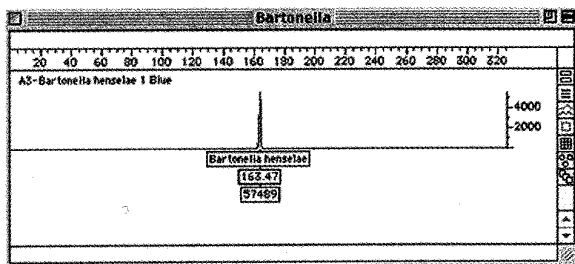
Alla master mix di reazione sono stati aggiunti 15 µl della diluizione finale in 100 µl del DNA estratto dalla coltura. La reazione di amplificazione è stata realizzata su un termociclatore GeneAmp PCR System 9700 usando il seguente protocollo: 30" di denaturazione a 95°C; 1' di annealing a 52°C, 90" di estensione a 72°C, seguiti da un'estensione finale di 5' a 72°C. La reazione di amplificazione ha coinvolto una regione di 260 bp (880-1140 nt). Il prodotto di PCR, dopo purificazione con esonucleasi e fosfatasi alcalina, è stato sottoposto a reazione di sequenziamento usando il kit specifico di sequenziamento in fluorescenza prodotto da Applied Biosystem e i reattivi di sequenza dedicati. La reazione di sequenza è stata realizzata su termociclatore 9700 Perkin Elmer utilizzando il protocollo specifico previsto. Il ceppo di *B. quintana* Oklahoma è stato sequenziato utilizzando lo stesso primer forward "freddo" usato per la reazione di PCR; l'isolato clinico JK14 è stato successivamente sequenziato utilizzando lo stesso primer reverse "freddo" utilizzato per la reazione di PCR. Il sequenziamento è stato condotto in elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI PRISM 310 e letto mediante il software Sequenze Analysis 3.4 (Applied Biosystem). Si è proceduto quindi ad una comparazione delle sequenze sperimentali con quelle riportate in GeneBank relative alla regione ITS di *B. quintana* strain Fuller (quale rappresentante del gruppo I di genotipizzazione),

strain Oklahoma (quale rappresentante del gruppo II) e strain URBQMTF 95 (quale rappresentante del gruppo III). La comparazione, infine, è stata eseguita mediante il software ABI Seq 1.0.3 (Applied Biosystem).

Risultati

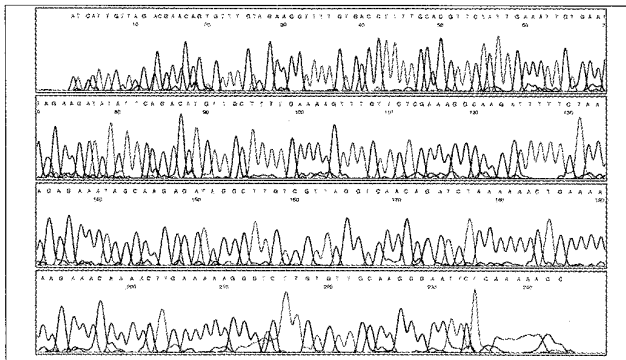
L'analisi elettroforetica su gel d'agarosio e l'analisi elettroforetica capillare su analizzatore genetico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem) dei prodotti di PCR dei tre ceppi batterici, in accordo con i dati di letteratura, ha mostrato, dopo analisi del sizing, un valore di 148 bp, per i due ceppi di *B. quintana* ed un valore di 163 bp per il ceppo di *B. henselae* (fig.3).

Figura 3. Prodotti di PCR ottenuti con primers di specie sottoposti ad elettroforesi capillare su analizzatore genetico ABI PRISM 310 (Perkin Elmer) di a) *B. quintana* ceppo Oklahoma, b) isolato clinico di *B. quintana* JK14, c) isolato clinico di *B. henselae* JK9R.



L'analisi di sequenza eseguita sul DNA estratto dalle colture batteriche dei due ceppi di *B. quintana* ha evidenziato in entrambi i casi una sequenza nucleotidica della regione ITS compresa tra 880 e 1140 nt perfettamente sovrapponibile a quella riportata in GeneBank, con la presenza di G in posizione 860 nt, 940 nt e 959 nt, e di A in posizione 1004. In figura 4 è riportato l'elettroferogramma di *B. quintana*. Le due sequenze sono state ottenute dall'analisi dei dati grezzi di elettroforesi attraverso il software Sequence Analysis 3.4 quindi poste a confronto diretto tra di esse e con le sequenze riportate in Genebank attraverso il software ABI Seq. 1.0.3. Questo software ha permesso il confronto diretto tra le due sequenze forward del ceppo Oklahoma e la reverse del ceppo JK14 invertendo testa-coda la sequenza reverse e trasformandola contemporaneamente nella sequenza complementare. Il ceppo JK14 è risultato Oklahoma compatibile ovvero appartenente al gruppo II di genotipizzazione.

Figura 4. Elettroferogramma riferito al sequenziamento della regione ipervariabile di 260pb dell'ITS 16S/23S rRNA di *B. quintana* ceppo Oklahoma



Discussione e conclusioni

La diagnosi di infezioni causate da *Bartonella* spp. attraverso indagini colturali è condizionata dalle esigenze metaboliche e dalla lenta crescita di tali batteri; anche le indagini sierologiche hanno mostrato limiti di sensibilità e specificità. Inoltre l'identificazione delle specie di *Bartonella* è importante per chiarire l'epidemiologia e le diverse manifestazioni cliniche delle infezioni causate sia nell'animale che nell'uomo.

Diversi metodi basati su tecniche di biologia molecolare sono stati proposti e la maggior parte di essi richiedono passaggi multipli con le conseguenti complicazioni e limitazioni. L'applicazione della metodica single-step PCR per la diagnosi di specie ed il sequenziamento della regione ipervariabile dell' ITS 16S/23S rRNA per la genotipizzazione dei ceppi potrebbero dare un ottimo contributo sia per la risoluzione delle problematiche diagnostiche e sia per gli studi epidemiologici e clinici correlati alle bartonellosi.

La metodica single-step PCR offre diversi vantaggi rispetto ad altre metodiche di diagnostica molecolare, in particolare è molto specifica, e questo è sottolineato dalla totale assenza di bande o picchi di amplificazione indesiderate oltre alla già dimostrata assenza di cross.-reazioni con molti altri generi batterici (10).

La metodica risulta sensibile; infatti, è stato riportato che con 5 µl di DNA di *B. henselae* la sensibilità è del 100 % per campioni con 50-100 CFU/ml e del 75 % per campioni con 10 CFU/ml (10).

La modifica da noi apportata, cioè l'aver eseguito il test in elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI PRISM 310, presenta numerosi vantaggi: a) mentre nel gel d'agarosio, ladder e campione corrono su due lane differenti, potendo generare dif-

ferenze di migrazione indipendenti dai frammenti di DNA ma relativi ad una diversa polimerizzazione del gel, con la metodica da noi riportata tale inconveniente viene eliminato, poiché standard e ampliconi migrano in elettroforesi nello stesso capillare, coniugati a fluorocromi differenti; b) utilizzando i prodotti di PCR specifici per le specie di *Bartonella* di importanza clinica tutti coniugati con il medesimo fluorocromo, si realizzerebbe concettualmente quello che in genetica forense viene chiamato un *ladder allelico*, specifico per *Bartonella* spp.: facendo migrare in elettroforesi capillare i suddetti prodotti di PCR insieme all'amplicone ignoto, coniugato a un fluorocromo differente, si procederebbe ad un confronto diretto dei tempi di passaggio dei frammenti arrivando ad allineare esattamente l'amplicone ignoto con il frammento noto della specie corrispondente; c) poiché la capacità discriminante dell'apparecchio è di +/- una base, esso risulta di grande utilità nella differenziazione tra *B. clarridgeiae* (145 bp) e *B. quintana* (148 bp), separate da sole 3 bp; d) un ulteriore vantaggio dell'elettroforesi capillare è dato dalla possibilità di potere eseguire un'analisi semi-quantitativa utilizzando il calcolo dell'area sottostante il picco dell'amplicone.

In conclusione, la single-step PCR risulta relativamente semplice nell'esecuzione, da la possibilità di fare al contempo diagnosi di genere e di specie con una sola reazione di PCR e utilizzando una singola coppia di primers ed inoltre analizzando l'amplificato in elettroforesi capillare in fluorescenza consente i sopra citati ulteriori vantaggi. Questi dati suggeriscono una possibile utilizzazione diagnostica di tale procedura.

L'analisi della sequenza di 260 bp all'interno dell'ITS di *B. quintana* compresa tra 880 e 1140 nt ha permesso di genotipizzare l'isolato clinico di *B. quintana* e di considerarlo come appartenente al gruppo II così come quello di riferimento.

La genotipizzazione di tutte le specie di *Bartonella* potrà essere utilizzata sia per chiarire le diverse manifestazioni cliniche che le infezioni causano nell'animale e nell'uomo e sia per comprendere l'epidemiologia di questi batteri.

Bibliografia

1. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 10, 203-219, 1997.
2. Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, Sander A. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 34, 254-260, 1999.
3. Birtles RJ. Differentiation of *Bartonella* species using restriction endonuclease analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 129, 261-266, 1995.
4. Birtles RJ, Raoult D. Comparison of partial citrate-synthase gene (gltA) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *Int.J. Syst.Bacteriol.* 46, 891-897, 1996.
5. Brouqui P, Raoult D. *Bartonella quintana* invades and multiplies within endothelial cells in vitro and in vivo and forms intracellular blebs. *Res Microbiol* 147, 719-731, 1996.
6. Conley T, Slater L, Hamilton K. Rochalimaea species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin Med* 124, 521-528, 1994.
7. Dehio C. Interactions of *Bartonella henselae* with vascular endothelial cells. *Curr Opin Microbiol* 2, 78-82, 1999.
8. Houpiqian P, Raoult D. 16S/23S rRNA Intergenic Spacer Region for Phylogenetic Analysis, Identification, and Subtyping of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2768-2778, 2001.
9. James EA, Hill J, Uppal R, Prentice MB. *Bartonella* infection: a significant cause of native valve endocarditis necessitating surgical management. *J Thor Card Surg* 119, 171-172, 2000.
10. Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt, EB. Rapid Identification and Differentiation of *Bartonella* Species Using a Single-Step PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1717-1722, 2000.
11. Kelly TM, Padmalayam I, Baumstark BR. Use of the cell division protein FtsZ as a means of differentiating among *Bartonella* species. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 766-772, 1998.
12. Liberto MC, Matera G. Pathogenic mechanisms of *Bartonella quintana*. *New Microbiol* 23, 449-456, 2000.
13. Liberto MC, Matera G, Lamberti AG, Barreca GS, Quirino A, Focà A. In vitro *Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells. *Diagn Microb. Infect. Dis.* In press 2002.
14. Massei F, Massimetti M, Messina F, Macchia P, Maggiore G. *Bartonella henselae* and inflammatory bowel disease. *The Lancet* 356, 1245-1246, 2000.
15. Maurin M, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. *Clin Microbiol Rev* 9, 273-292, 1996.
16. Rodriguez-Barradas MC, Hammill RJ, Houston ED, Georgiou PR, Clarridge JE, Regnery R.L, Koheler JE. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol* 33, 1089-1093, 1995.
17. Roux V, Raoult D. Inter- and intraspecies identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1573-1579, 1995.