

# Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati

M.L. Sammarco\*, G. Ripabelli\*, M. Tamburro\*

*Key words: Molecular epidemiology, infectious diseases, genotyping, methods, results interpretation*  
*Parole chiave: Epidemiologia molecolare, malattie infettive, genotipizzazione, metodi, interpretazione dei risultati*

## Abstract

### ***Molecular epidemiology of infectious diseases: analytical methods and results interpretation***

*Molecular typing and fingerprinting of microbial pathogens represent an essential tool for the epidemiological surveillance, outbreak detection and control of infectious diseases. Indeed, epidemiological investigation without genotyping data may not provide comprehensive information to allow the most appropriate interventions; despite this consideration, some barriers still hamper the routine application and interpretation of molecular typing data. In this paper, the most important methods currently used for characterization of pathogenic microorganisms for microbial source tracking and for the identification of clonal relationships among different isolates, are described according to their principles, advantages and limitations. Criteria for their evaluation and guidelines for the correct interpretation of results are also proposed. Molecular typing methods can be grouped into four categories based on different methodological principles, which include the characterization of restriction sites in genomic or plasmid DNA; the amplification of specific genetic targets; the restriction enzyme digestion and the subsequent amplification; sequence analysis. Although the development and the extensive use of molecular typing systems have greatly improved the understanding of the infectious diseases epidemiology, the rapid diversification, partial evaluation and lack of comparative data on the methods have raised significant questions about the selection of the most appropriate typing method, as well as difficulties for the lack of consensus about the interpretation of the results and nomenclature used for interpretation. Several criteria should be considered in order to evaluate the intrinsic performance and practical advantages of a typing system. However none of the available genotyping methods fully meets all these requirements. Therefore, the combined use of different approaches may lead to a more precise characterization and discrimination of isolates than a single method, especially if used in a hierarchical manner. The interpretation of the molecular results differs according to the typing system's characteristics: for example in the restriction fragments-based analysis, the divergences or the similarity percentages among the profiles are evaluated, whilst the differences in terms of number and intensity of bands are analyzed in the amplification-based approaches. Moreover, a correct interpretation of molecular results significantly depends by other critical factors, such as the comprehension of the typing system and data quality, the microbial diversity, and the epidemiological context in which the method is used. The analysis of PFGE data, considered as the "gold standard", is based on the differences of the number and position of bands patterns, although recent recommendations are now available from the Centers for Diseases Control and Prevention (CDC) for a more accurate interpretation, which also include the evaluation of the gel quality, the genetic diversity of the microorganism, the time and geographical scale of an epidemic event. Future advances in the molecular typing technologies indeed will provide rapid methodological improvements, such as a greater degree of automation, better resolution, higher throughput, and a greater availability of*

---

\* Cattedra di Igiene, Dipartimento di Medicina e di Scienze della Salute, Università degli Studi del Molise

*dedicated bioinformatics tools. These factors will all contribute to an increasing application of genotyping methods to better understand the epidemiology of infectious diseases, and to implement, along with the strengthened international and interdisciplinary partnerships, more effective control and prevention strategies for Public Health improvements.*

## Introduzione

L'emergenza e la riemergenza di molte malattie infettive rappresentano un importante problema di Sanità Pubblica correlato a numerosi fattori tra loro interconnessi come i cambiamenti demografici, gli stili di vita, le modifiche tecnologiche e industriali, l'aumento dei viaggi e del commercio internazionale, l'adattamento microbico, etc.

Un efficace controllo delle malattie infettive dipende da diversi fattori, quali la rapidità di individuazione e caratterizzazione degli agenti etiologici, la predisposizione di sistemi di sorveglianza epidemiologica per verificare l'andamento delle malattie e l'effetto dei programmi di controllo e prevenzione delle infezioni. A fine novembre 2012 è stata avviata, infatti, un'attività di sorveglianza molecolare (Molecular Surveillance Service-MSS), gestita da "The European Surveillance System" (TESSy), che consente ai Paesi dell'Unione Europea e dell'Area Economica Europea di caricare in una banca dati, istituita presso lo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), profili e dati molecolari per *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* (VTEC/STEC) e *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente (MDR-TB). Gli obiettivi di questo servizio mirano a migliorare la velocità di riconoscimento degli eventi epidemici che possono verificarsi contemporaneamente anche in più Paesi Europei; riconoscere retrospettivamente le sorgenti di infezione ed i fattori di rischio in maniera più efficace; migliorare le indagini per l'individuazione delle vie di trasmissione dei microrganismi patogeni, in Europa e a livello globale; mi-

gliorare la capacità degli Stati Membri di rispondere in maniera rapida ed efficace al verificarsi di episodi epidemici (1). Appare ovvio, quindi, che, attualmente, un'indagine epidemiologica senza l'approccio molecolare è da considerarsi incompleta e non in grado di fornire informazioni esaustive per una corretta definizione del quadro epidemiologico. Le tecniche molecolari, infatti, consentono lo studio dell'epidemiologia delle infezioni con un approccio integrato rispetto ai metodi tradizionali, fornendo strategie sempre più accurate di caratterizzazione dei microrganismi patogeni, in grado di stabilire i livelli di clonalità e tracciabilità dei microrganismi isolati.

L'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi patogeni a livello di specie sono importanti per la diagnosi, la terapia e la sorveglianza epidemiologica delle infezioni, soprattutto nel caso di batteri con elevati livelli di antibiotico-resistenza e quelli implicati nelle infezioni nosocomiali o pandemiche (2, 3).

I metodi utilizzati per tipizzare i microrganismi sono la fenotipizzazione e la genotipizzazione; il primo si basa sull'analisi dei caratteri fenotipici dei microrganismi, come la morfologia delle colonie, l'analisi di caratteristiche biochimiche, sierologiche, di virulenza, patogenicità e antibiotico-resistenza; il secondo, invece, sull'analisi del corredo genomico dei microrganismi, considerando che i caratteri fenotipici sono fattori strettamente connessi alla diversità genetica. Con il termine di genotipizzazione si intende l'assegnazione di uno stipite ad un particolare gruppo o "tipo" di individui, appartenenti ad una determinata categoria

tassonomica e aventi in comune le stesse caratteristiche genetiche. È noto, infatti, che all'interno delle popolazioni di patogeni appartenenti alla stessa specie, o alla stessa popolazione, esiste un'ampia diversità genetica costituita da sotto-popolazioni più o meno numerose e geneticamente uniformi, chiamate "cloni", che riflette la divergenza evolutiva derivante da mutazioni e trasferimento di geni all'interno della stessa specie o popolazione. Patogeni correlati in modo clonale esibiscono caratteri significativamente più simili rispetto a patogeni non correlati; questi caratteri o marcatori epidemiologici possono essere "misurati" attraverso metodi che consentono di discriminare i patogeni tra loro. Un marcatore molto utilizzato per l'identificazione molecolare dei batteri è il gene 16S rRNA, altamente conservato tra i batteri perché essenziale per la sintesi proteica; tuttavia, proprio perché altamente conservato, tale gene non può essere utilizzato per la caratterizzazione a livello di ceppo, per cui molto spesso si ricorre all'utilizzo di altri geni meno conservati codificanti per proteine batteriche di superficie o fattori di virulenza e la scelta dei geni più appropriati varia a seconda della specie. La combinazione di geni codificanti per antigeni di superficie o fattori di virulenza con geni "housekeeping" (geni che codificano per proteine fondamentali per la vita del microrganismo) è un approccio razionale per la tipizzazione batterica, specialmente per le specie con elevato tasso di ricombinazione genetica.

Differenti sono i metodi di tipizzazione molecolare ed i criteri utilizzati per valutarli e validarli (Tabella 1). Essi vengono distinti in criteri di "performance" e criteri di "convenienza"; il primo gruppo comprende: a) la *stabilità* dei marcatori che vengono considerati tali se isolati multipli dello stesso ceppo epidemico, ottenuti da differenti pazienti in differenti momenti, sono indistinguibili in seguito alla tipizzazione basata su quel marker e sono marcatori ideali quelli che, necessariamente, rimangono stabili durante

tutto il periodo di studio a partire dall'isolamento primario sino alla conservazione e subcultura in laboratorio; b) la *capacità di tipizzare*, cioè l'abilità di un metodo di assegnare un "tipo" a tutti gli isolati testati e può essere espressa come percentuale di isolati tipizzabili rispetto al numero totale di isolati tipizzati; c) il *potere discriminante*, ossia la capacità di un metodo di assegnare "tipi" diversi a due ceppi non correlati e campionati "casualmente" all'interno di una popolazione di una data specie (e può essere espresso sottoforma di "indice di diversità di Simpson") che idealmente dovrebbe corrispondere a 1.00, mentre nella pratica, un metodo di tipizzazione "ideale", dovrebbe raggiungere un valore superiore a 0.95 (4); metodi di tipizzazione che valutano la presenza di polimorfismi in più siti genomici sono, generalmente, più discriminanti rispetto a metodi che esplorano un singolo sito; d) la *concordanza epidemiologica*, ossia i risultati di tipizzazione dovrebbero riflettere, confermare e possibilmente chiarire le informazioni epidemiologiche già disponibili (ad esempio, un isolato che deriva presumibilmente da un singolo ceppo o un singolo clone epidemico dovrebbe essere assegnato ad un "tipo" identico o epidemiologicamente correlato); e) la *riproducibilità*, ossia la capacità di un metodo di assegnare lo stesso "tipo" ad un isolato testato in esperimenti indipendenti, separati nel tempo e/o nello spazio (essa può essere influenzata da alcuni importanti fattori come la tipologia di lotti/reagenti e/o di apparecchiature utilizzate, errori nella registrazione dei dati, analisi e interpretazione dei risultati); è quanto mai importante assicurare sia una riproducibilità intra-laboratorio sia inter-laboratorio ed entrambe richiedono una standardizzazione dei protocolli e personale adeguatamente formato.

Fra i criteri di "convenienza" consideriamo: a) la *flessibilità*, che riflette la capacità di un metodo di essere utilizzato per tipizzare molteplici specie microbiche con minime

Tabella 1- Principali caratteristiche dei vari metodi di tipizzazione molecolare

Metodo	Criteri di "performance"				Criteri di "convenienza"			
	Stabilità	Tipizzabilità	Potere discriminante	Riproducibilità	Facilità di esecuzione	Facilità di interpretazione	Tempo per i risultati <sup>#</sup>	Costo
Analisi plasmidica	variabile	variabile	variabile	buona	moderata	facile	breve	basso
RFLP	buona	eccellente	variabile	eccellente	facile	variabile*	variabile	basso
Ribotipizzazione	buona	eccellente	buono	eccellente	facile	facile	variabile	variabile <sup>§</sup>
PFGE	buona	eccellente	eccellente	eccellente	laboriosa	moderata	medio/lungo	alto
RAPD-PCR e AP-PCR	bassa	buona	buono	bassa	facile	moderata	breve	basso
rep-PCR	moderata	buona	buono	moderata	facile	facile	breve	basso
HRM	buona	eccellente	alto	buona	moderata	moderata	breve	alto
AFLP	buona	eccellente	alto	buona	moderata	facile	medio	basso
Sequenziamento genico	buona	eccellente	eccellente	eccellente	facile	moderata	medio	moderato
MLST	buona	buona	variabile <sup>&amp;</sup>	buona	moderata	moderata	lungo	alto
VNRT-MLVA	buona	buona	eccellente	eccellente	facile	moderata	breve	moderato
SNPs	buona	eccellente	buono	buona	facile	moderata	medio	moderato

\*dipende dal numero delle bande;

<sup>&</sup>dipende dal gene scelto;<sup>#</sup>breve=max 1 giorno; medio=max 2 giorni; lungo=max 3 giorni; variabile=da 1 a 3 giorni in base al metodo o agli enzimi;<sup>§</sup>dipende dal costo delle apparecchiature

Tabella 2 - Siti web più utilizzati per la genotipizzazione batterica

Metodo	Sito web	Descrizione
RFLP	<a href="http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/rflpquery">http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/rflpquery</a>	Database RFLP per <i>Escherichia coli</i> patogeni
Ribotipizzazione	<a href="http://www.dipnet.org/ribo.public.php">http://www.dipnet.org/ribo.public.php</a>	Database ribotipi batterici
PFGE	<a href="http://www.cdc.gov/pulsenet/">http://www.cdc.gov/pulsenet/</a> <a href="http://www.pulsenet-europe.org/">http://www.pulsenet-europe.org/</a> <a href="http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&amp;HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733757088">http://www.hpa.org.uk/web/HPAweb&amp;HPAwebStandard/HPAweb_C/1195733757088</a> <a href="http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx">http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/default.aspx</a>	Database PFGE per microrganismi patogeni a trasmissione alimentare (CDC) Database PFGE per microrganismi patogeni a trasmissione alimentare (Europe) Database PFGE per <i>Salmonella</i> spp. Database PFGE per <i>Escherichia coli</i> Protocolli operativi di PFGE standardizzati
AFLP	<a href="http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/ALFIE/index.cgi">http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/ALFIE/index.cgi</a>	Database AFLP per <i>Legionella pneumophila</i> Database AFLP per <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
GeneBank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Database contenente sequenze di DNA
SLST	<a href="http://spaserver.ridom.de/">http://spaserver.ridom.de/</a>	Database SLST per <i>S. aureus</i>
MLST	<a href="http://www.mlst.net">http://www.mlst.net</a> <a href="http://pubmlst.org">http://pubmlst.org</a> ; <a href="http://mlst.ucc.ie/">http://mlst.ucc.ie/</a> ; <a href="http://www.pasteur.fr/mlst">http://www.pasteur.fr/mlst</a> <a href="http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php">http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php</a> <a href="http://www.hpa.org.uk/cfi/bioinformatics/dbases.htm#EWGLI">http://www.hpa.org.uk/cfi/bioinformatics/dbases.htm#EWGLI</a> <a href="http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/dbquery">http://www.shigatox.net/ecmlst/cgi-bin/dbquery</a> <a href="http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html">http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Abaumannii.html</a>	Database MLST per differenti specie batteriche “ Database MLST per <i>Legionella pneumophila</i> “ Database MLST per <i>Escherichia coli</i> patogeni Database MLST per <i>Acinetobacter baumannii</i>
MLVA	<a href="http://tandem.bu.edu/trf/trf407b.win.download.html">http://tandem.bu.edu/trf/trf407b.win.download.html</a> <a href="http://cagt.bu.edu/page/TRDB_about">http://cagt.bu.edu/page/TRDB_about</a> <a href="http://insilico.ehu.es/microsatellites/">http://insilico.ehu.es/microsatellites/</a>	Software per testare ed identificare le sequenze ripetute Database contenente sequenze ripetute Database per la ricerca di microsatelliti ripetuti

modifiche; i metodi di sequenziamento mostrano ottima flessibilità poiché è possibile tipizzare differenti specie utilizzando stessi principi, apparecchiature e reagenti al contrario di altri metodi che, invece, hanno necessità di essere ottimizzati e validati per ogni specie microbica analizzata (ad esempio, i primers disegnati per una specie non sono generalmente utilizzati per un'altra); b) la *rapidità*, indica il tempo totale richiesto per

la conduzione dell'indagine, partendo dagli isolati batterici fino all'ottenimento dei risultati finali di tipizzazione, inclusa l'interpretazione dei risultati; c) l'*accessibilità*, ossia la disponibilità di reagenti, apparecchiature e attitudini richieste al personale; d) la *facilità di esecuzione*, comprende la semplicità della tecnica, il carico di lavoro, la possibilità di processare un gran numero di isolati; e) la *facilità nell'interpretazione dei risultati*; f)

il *costo*, incluso quello dei reagenti, delle apparecchiature e di manutenzione; f) l'*analisi computerizzata* e l'*utilizzo di banche dati (database) elettronici*, importanti per la comparazione longitudinale di un gran numero di isolati (Tabella 2). A livello locale, i dati ottenuti attraverso i metodi di tipizzazione possono essere analizzati elettronicamente o valutati visivamente, mentre la diffusione di cloni batterici a livelli regionale e/o internazionale richiede, necessariamente, la creazione di database elettronici utili per monitorare l'andamento della diffusione dei ceppi o dei cloni (5, 6).

## I metodi di tipizzazione molecolare

La tipizzazione molecolare può essere effettuata attraverso l'utilizzo di vari metodi molecolari che differiscono fra loro per il meccanismo di funzionamento (Fig. 1). Essi vengono suddivisi in metodi basati su: *a)* restrizione enzimatica, *b)* amplificazione genica, *c)* restrizione enzimatica seguita da amplificazione genica, e *d)* sequenziamento.

### A) Metodi basati su restrizione enzimatica

Le tecniche di tipizzazione molecolare, basate su digestione enzimatica del DNA plasmidico/genomico, sono: l'analisi plasmidica; l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP); la ribotipizzazione e l'elettroforesi su gel in campo pulsato (Pulsed-field Gel Electrophoresis - PFGE).

#### *Analisi plasmidica*

I plasmidi sono molecole di DNA extracromosomale, capaci di replicarsi autonomamente, identificati molto spesso in isolati batterici non correlati e contenenti geni che codificano per specifiche proprietà come i fattori di virulenza e la resistenza agli antimicrobici (7, 8). Un batterio può essere privo di plasmidi o possedere più plasmidi, che

possono essere acquisiti o persi in risposta alla pressione selettiva (9). L'analisi della presenza, del numero e peso molecolare dei plasmidi può risultare utile per la determinazione di eventuali differenze nella storia naturale dei ceppi batterici; tuttavia, appare poco adatto per lo studio delle relazioni clonali tra isolati diversi, mentre è spesso utilizzato per la determinazione dell'evoluzione e della diffusione della resistenza agli antimicrobici nei casi di infezioni nosocomiali e per lo studio dell'emergenza di ceppi antibiotico-resistenti. La tipizzazione molecolare degli isolati consiste, sostanzialmente, nell'isolamento del DNA plasmidico, ottenuto in seguito alla distruzione del DNA cromosomale (10), e nel confronto del numero e del peso molecolare dei plasmidi isolati mediante elettroforesi su gel di agarosio (Fig. 1). Tuttavia, in alcuni casi, specialmente quando i batteri possiedono plasmidi di elevato peso molecolare (100-150 kb) e, pertanto, la separazione su gel potrebbe risultare difficile, è necessario, dopo l'isolamento del DNA plasmidico, eseguire una fase di digestione con endonucleasi di restrizione (Restriction Endonuclease Analysis of Plasmids - REAP), al fine di generare più frammenti; tale accorgimento facilita l'interpretazione dei risultati ottenuti e quindi lo studio delle relazioni tra ceppi aumentando il potere discriminante del metodo (11).

L'analisi plasmidica è stata ampiamente utilizzata per la caratterizzazione di vari microrganismi patogeni a trasmissione alimentare (12-16) e responsabili di infezioni nosocomiali (17-19). Essa, tuttavia, presenta alcuni limiti in quanto non può essere utilizzata per la tipizzazione di microrganismi patogeni privi di plasmidi e, a causa del trasferimento dei plasmidi tra ceppi batterici, anche isolati epidemiologicamente correlati potrebbero mostrare differenti profili plasmidici (20-22). Il contenuto in plasmidi non è, pertanto, utilizzato per valutare le eventuali relazioni tra ceppi, tranne che in caso di un sospetto evento epidemico nosocomiale in

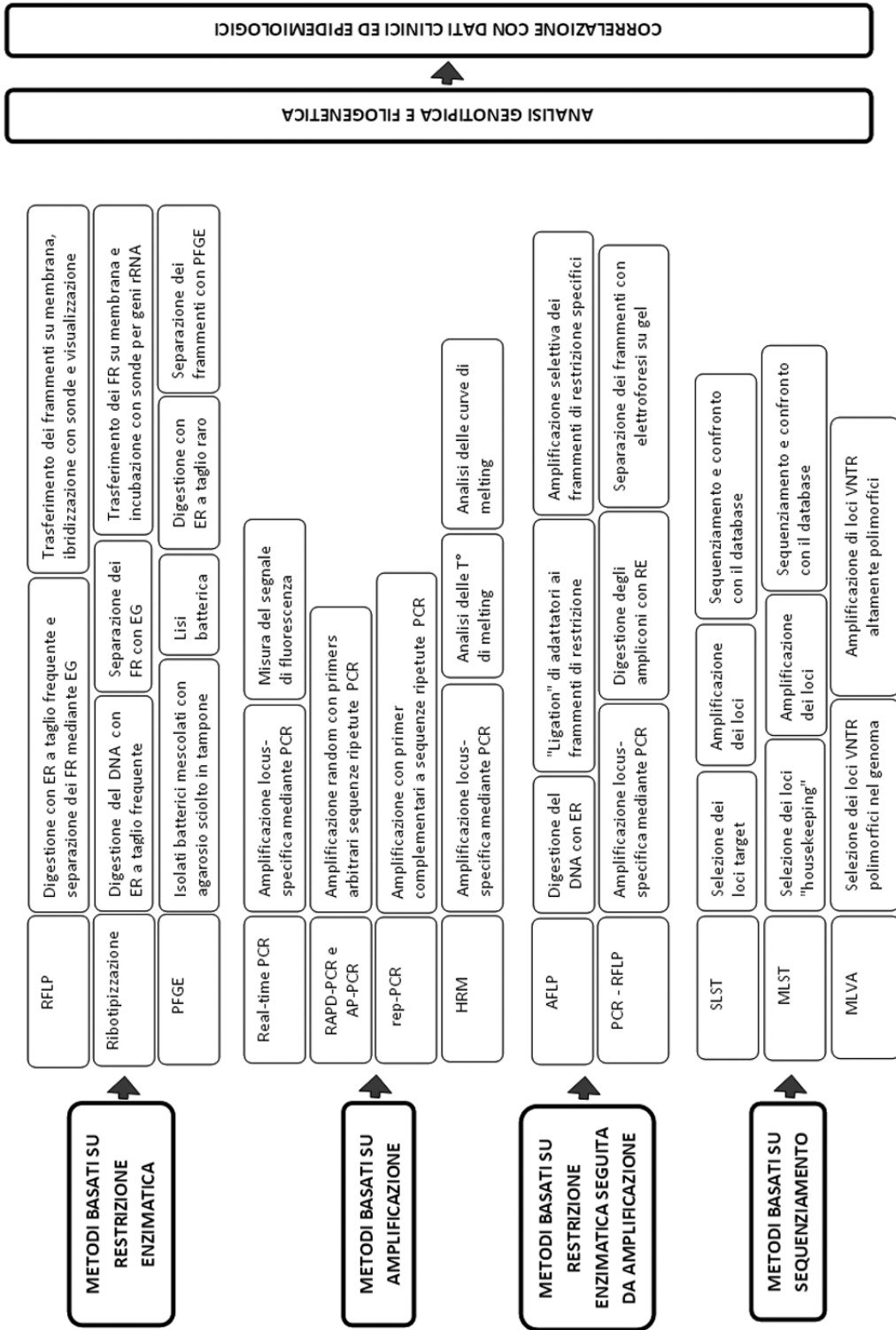


Fig. 1 - Diagramma di flusso dei metodi molecolari per l'indagine epidemiologica. ER = Enzimi di Restrizione; FR = Frammenti di Restrizione; EG = Elettroforesi su Gel.

cui gli isolati presentano tre o più plasmidi in comune, come è stato osservato tra ceppi di stafilococchi coagulasi-negativi, *Klebsiella pneumoniae* e altri batteri gram-negativi. In questo caso, con un certo grado di “confidenza”, i ceppi possono essere definiti epidemiologicamente correlati senza ulteriori conferme (22).

### *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

Tale metodica è stata utilizzata per la prima volta negli anni '80 per la tipizzazione di virus, funghi e batteri (23-26) e rappresenta una delle tecniche di tipizzazione più impiegate per l'individuazione di variazioni (come inserzioni, delezioni o differenze nucleotiche) nella sequenza genomica specifica per l'enzima di restrizione selezionato (27).

La RFLP prevede una fase di digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione (“restriction enzyme” - RE) con siti di taglio frequenti (“frequent cutting”) e una successiva corsa elettroforetica su gel di agarosio che genera un profilo (“fingerprinting”) costituito da più di 100 frammenti di restrizione (“restriction fragment” - RF), rendendo molto spesso difficile il confronto tra differenti isolati batterici (28). Per ovviare a tale inconveniente possono essere utilizzati due diversi approcci: il primo prevede l'utilizzo di enzimi di restrizione che tagliano il DNA in siti di taglio poco frequenti (“rare cutting restriction enzyme”) seguita da elettroforesi per separare i grandi frammenti generati; il secondo, invece, comporta il trasferimento dei frammenti di DNA su membrane di nitrocellulosa o nylon (Southern blotting) (28) e successiva ibridazione con una sonda marcata per specifici frammenti ripetuti presenti nel genoma batterico (Fig. 1). Nell'analisi dei profili generati si tiene conto sia del peso sia del numero dei frammenti di restrizione omologhi alla sonda. Tale approccio permette di generare un profilo di restrizione di un determinato microrganismo e poiché ceppi differenti possiedono un contenuto

genomico differente, anche ceppi della stessa specie epidemiologicamente non correlati mostrano generalmente un profilo di restrizione differente.

Sonde gene-specifiche sono state utilizzate per tipizzare alcuni microrganismi patogeni come *Brucella* spp., *Legionella pneumophila* e *Pseudomonas aeruginosa* (30-32) ma anche alcuni patogeni a trasmissione alimentare come *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* ed *E. coli* patogeni (33-35).

### *Ribotipizzazione*

Tale metodo segue l'approccio della RFLP in cui il profilo generato è semplificato dalla visualizzazione dei soli frammenti che contengono geni codificanti per l'RNA ribosomiale (rRNA) (36).

Il metodo prevede una digestione iniziale del DNA genomico con enzimi di restrizione (ad esempio *EcoRI*, *PvuII*, etc.), che presentano siti di taglio frequenti, seguita da una corsa elettroforetica su gel di agarosio; i frammenti di restrizione generati sono poi trasferiti su una membrana (Southern blotting) ed incubati con sonde specifiche per le regioni conservate dei geni rRNA (Fig. 1). Le differenze nel numero dei geni e la variabilità genetica delle regioni che li fiancheggiano generano un ribotipo (profilo con frammenti di restrizione distinti), costituito generalmente dai 5 ai 15 frammenti, utilizzato per discriminare i ceppi batterici (36).

Tale metodica può essere impiegata, virtualmente, per tutti i batteri e funghi patogeni per la facilità nell'interpretazione dei risultati, poiché vengono prodotti pochi frammenti, e per l'elevata riproducibilità e tipizzabilità; tuttavia, possiede un potere discriminante molto più basso rispetto ad altre tecniche molecolari (6, 37) (Tabella 1). In commercio è disponibile un sistema automatizzato di ribotipizzazione (RiboPrinter Microbial Characterization System-Qualicon, Inc. Wilmington, DE; [http://www2.dupont.com/Qualicon/en\\_US/products/RiboPrinter](http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/products/RiboPrinter)



ter\_System/index.html), che offre la possibilità di caratterizzare vari microrganismi patogeni (38), di processare i campioni in tempi molto rapidi e di poter confrontare i dati ottenuti tra diversi laboratori mediante la consultazione di database dedicati (Tabella 2). Tuttavia, il basso potere discriminante ed il costo eccessivo del sistema automatizzato, hanno comportato, negli ultimi anni, un netto decremento dell'utilizzo di tale metodica.

La ribotipizzazione è stata utilizzata per genotipizzare microrganismi patogeni come *Campylobacter* spp., *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes* (39-44).

#### *Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)*

La PFGE è una delle tecniche di tipizzazione molecolare più comunemente utilizzata per la caratterizzazione molecolare di numerosi microrganismi patogeni a trasmissione alimentare e di patogeni responsabili di infezioni nosocomiali (45-55). Tale metodo di tipizzazione, considerato il "gold standard", prevede una digestione enzimatica dell'intero DNA genomico con enzimi di restrizione che effettuano pochi tagli ("rare cutting restriction enzyme"), in modo da generare un numero di frammenti molto piccolo (8-25) ma di grandi dimensioni (tra 40 e 600 kb) che vengono separati mediante l'utilizzo di un sistema elettroforetico a campo pulsato, in cui l'orientamento del campo elettrico viene periodicamente cambiato al fine di ottenere una migliore separazione dei frammenti (56) (Fig. 1). Al termine della corsa elettroforetica si ottiene un profilo di bande, o pulstipo, che può variare da ceppo a ceppo sia per il numero di bande generato sia per il peso molecolare che dipende dalla collocazione nel genoma dei siti di restrizione dell'enzima utilizzato. La scelta dell'enzima è uno dei fattori più importanti nel determinare il profilo molecolare, poiché il sito di taglio per ciascun enzima è unico; quelli più comunemente utilizzati sono *XbaI*, *BlnI*, *SpeI*, *SmaI*, *KpnI*, *AscI*, *NotI*,

*ApaI*, *SfiI*, (54, 57-61). I frammenti generati possono essere analizzati e confrontati per mezzo dell'utilizzo di software dedicati (quali BioNumerics e GelCompare, Applied Maths) che permettono di riconoscere le posizioni delle bande e di calcolare il peso molecolare dei frammenti di DNA usando una matrice matematica che analizza le somiglianze dei profili (Tabella 2). L'eventuale correlazione tra ceppi può essere stabilita mediante il calcolo di differenti algoritmi di "clustering" e coefficienti di correlazione; la combinazione più comunemente utilizzata è l'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) in associazione con il coefficiente di Dice. Nella maggior parte degli studi epidemiologici, per l'analisi dei cluster viene utilizzato un coefficiente di similarità pari a 0.80 (80% di similarità) come livello di cut-off.

Tale metodica, tuttavia, presenta alcuni svantaggi come la laboriosità, il tempo necessario per la conduzione dell'analisi (circa tre giorni compresa l'interpretazione dei risultati) e l'utilizzo di apparecchiature relativamente costose (Tabella 1). Inoltre, se un "evento" genetico non influenza significativamente la mobilità di un frammento di DNA sottoposto ad elettroforesi, tale cambiamento potrebbe non essere identificato come un pulstipo diverso; per ovviare a tale inconveniente sarebbe opportuno utilizzare enzimi di restrizione differenti al fine di confermare le eventuali relazioni genetiche tra i ceppi (9). I vantaggi sono, invece, rappresentati dall'elevato potere discriminante e dall'elevata riproducibilità della tecnica per un grande numero di ceppi batterici consentendo, così, di paragonare i dati tra più laboratori; inoltre, il profilo genetico ottenuto non scaturisce dall'analisi di una limitata sequenza target, come si verifica per alcune tecniche di tipizzazione basate su PCR, bensì dall'analisi dell'intero genoma batterico (33).

Data l'elevata quantità di pattern generati dalla PFGE, è emersa la necessità di

standardizzare i protocolli e i criteri per la tipizzazione batterica, fino allo sviluppo di database online per il confronto globale dei profili di PFGE (Tabella 2). Pertanto, i Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, USA), in collaborazione con altri laboratori di ricerca, hanno istituito un network, denominato PulseNet, per la sorveglianza molecolare delle infezioni trasmesse da alimenti basata sull'analisi dei profili molecolari ottenuti mediante PFGE (62-64). Nel sito internet di riferimento sono disponibili i protocolli di laboratorio di PFGE standardizzati per *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* non tifoidea, *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *Yersinia pestis* (65-69) (Tabella 2).

### **B) Metodi basati su amplificazione genica**

I metodi basati su amplificazione permettono di verificare la presenza o assenza di determinati geni e comprendono: la Polymerase Chain Reaction (PCR), la Real-time PCR e Multiplex Real-time PCR; la Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) e/o Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR); la Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR), l'High Resolution Melting analysis (HRM) e la Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) analysis.

#### *Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-time PCR e Multiplex Real-time PCR*

La composizione del DNA genomico di molti microrganismi patogeni è altamente variabile, anche nell'ambito di una stessa specie, fenomeno da attribuire, in parte, al trasferimento orizzontale di geni. L'assetto genico di un ceppo microbico può essere una caratteristica utile per distinguere ceppi diversi; è vero, infatti, che un'attenta analisi dei profili di amplificazione permette di tipizzare gli isolati batterici. Mediante PCR possono essere valutati molteplici geni ed in partico-

lare quelli associati a fattori ospite-specifici (incluso l'utilizzo di nutrienti), virulenza e resistenza agli antimicrobici (70).

Da molto tempo vengono utilizzati saggi convenzionali di PCR disegnati per la determinazione di un singolo gene target, che per i patogeni umani si basano sull'analisi di specifici loci utili per l'identificazione tassonomica e la caratterizzazione di importanti tratti fenotipici, come i determinanti per l'antibiotico-resistenza o i fattori di virulenza. Tale metodica permette di differenziare isolati non correlati e di identificare geni specifici d'importanza clinica. Sebbene il metodo di PCR presenti molti vantaggi ha, tuttavia, un grande inconveniente, ossia l'incapacità di differenziare microrganismi vitali e non vitali.

Da alcuni anni è stata introdotta una forma alternativa alla comune PCR, denominata Real-time PCR, che permette di aumentare la sensibilità e l'affidabilità dei risultati ottenuti con la PCR tradizionale e si basa sulla misura del segnale di fluorescenza che viene generato ad ogni ciclo di amplificazione; maggiore è la quantità di DNA presente nel campione da analizzare, più precoce sarà il ciclo di amplificazione nel quale è rivelato il segnale di fluorescenza (Fig. 1). Un vantaggio significativo introdotto dalla Real-time PCR è la rapidità con la quale si ottengono i risultati insieme alla riduzione dei tempi necessari per ogni ciclo di reazione e alla mancanza di procedure di rilevazione post-PCR (71); inoltre, tale metodo permette di amplificare e rivelare il segnale simultaneamente, in un sistema chiuso, evitando il rischio di contaminazioni. La Real-time effettua il rilevamento del DNA amplificato mediante l'impiego di coloranti fluorescenti intercalanti aspecifici, come SYBR Green, e di sonde specifiche ad ibridizzazione; le sonde oligonucleotidiche fluorescenti maggiormente utilizzate si basano sul processo spettroscopico del trasferimento di energia di risonanza in fluorescenza fra due fluorofori adiacenti (TaqMan, Fluorescence Reso-

nance Energy Transfer - FRET, Molecular Beacons, Scorpions) e sono marcate rispettivamente con una molecola reporter (donatore) e una molecola quencher (accettore), scelte in modo che lo spettro di emissione del donatore si sovrapponga allo spettro di assorbimento dell'accettore. Le sonde più utilizzate sono le TaqMan e presentano la caratteristica di essere idrolizzate dall'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi; il reporter ed il quencher si trovano sullo stesso oligonucleotide sonda (diverso dalla coppia di primer), per cui la fluorescenza è nascosta. Dopo che la sonda si è legata al filamento di DNA, a distanza ravvicinata tra i primers, la Taq polimerasi, con la sua attività esonucleasica, inizia l'estensione dei primers tagliando il reporter il quale non risultando più nascosto dal quencher emette fluorescenza che viene misurata. Appare evidente che più avanzano i cicli di reazione della PCR, più sonde si legano e più ne vengono idrolizzate, incrementando così la fluorescenza registrata. La progressione della Real-time PCR può essere, pertanto, misurata monitorando i cambiamenti dei livelli di fluorescenza, che dipendono da quanto prodotto di PCR viene accumulato. Se la molecola target è assente, la sonda non è in grado di ibridizzare e la sua fluorescenza è nascosta dal quencher. Utilizzando sonde oligonucleotidiche diverse, marcate con fluorofori diversi e "quencher" non fluorescenti è possibile rilevare più ampliconi contemporaneamente mediante la Multiplex Real-time PCR (72).

Tali metodiche trovano applicazione per lo studio di differenti microrganismi patogeni come *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), *Bacillus cereus* (73-77).

*Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) e/o Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)*

Entrambi i metodi, RAPD-PCR e AP-PCR, si basano sullo stesso principio di

funzionamento e permettono di amplificare piccoli frammenti genomici utilizzando primers (composti generalmente corti da 6 a 10 paia di basi), che si appaiano casualmente al DNA genomico ogni qualvolta trovano una sequenza complementare (Fig. 1). I due termini (RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA e AP - Arbitrarily Primed) possono essere intercambiabili in quanto le due metodiche differiscono sostanzialmente in piccole variazioni come la lunghezza dei primers, la temperatura di annealing e pochi altri parametri. Indipendentemente dalla lunghezza del primer utilizzato, l'amplificazione è resa possibile dal fatto che la reazione di PCR viene effettuata in condizioni di bassa stringenza (utilizzando, per esempio, una temperatura di appiamento del primer molto bassa) rendendo stabili eventuali appaiamenti del primer anche a sequenze del DNA non perfettamente complementari alla propria. In generale, quanto maggiore è la complementarità tra i primers e le sequenze bersaglio, tanto maggiore sarà l'efficienza con la quale un segmento di DNA sarà amplificato. Al termine del saggio si otterranno, pertanto, frammenti amplificati di lunghezza differente e specifici per ciascun ceppo. I frammenti risultano molto spesso variabili e polimorfici, consentendo, pertanto, di effettuare un'indagine efficace della variabilità intraspecifica. I profili di amplificazione di ceppi identitici, devono risultare perfettamente identici (formati cioè dalle stesse bande) mentre profili diversi sono generati da microrganismi diversi, anche nell'ambito della stessa specie. La diversità è determinata dalla variabilità della sequenza genomica che fa sì che alcuni siti di appaiamento del primer, presenti in uno dei due genomi, siano assenti nell'altro e viceversa. Maggiore è la divergenza nucleotidica tra i due genomi, maggiore sarà la differenza tra i loro profili e quindi maggiore il numero di bande non condivise.

Queste metodiche risultano particolarmente vantaggiose sia perché non richiedo-

no una conoscenza a priori del genoma da testare, in quanto i primers sono generici e utilizzabili per diversi batteri, sia perchè sono molto rapide, facili da applicare, poco costose (un termociclature e una cella elettroforetica) e richiedono una ridotta quantità di DNA (78). Tuttavia, pur presentando una buona capacità di tipizzazione (virtuale del 100%) ed un buon potere discriminante, anche se tipicamente inferiore rispetto alla PFGE e all'AFLP (79), hanno un basso grado di riproducibilità a causa della bassa stringenza nelle condizioni di amplificazione, tanto da essere influenzata anche da minime variazioni nella tipologia dei reagenti, condizioni di amplificazione, parametri di analisi, etc. (80) (Tabella 1).

I metodi sono frequentemente utilizzati per lo studio di procarioti ed eucarioti, e nella conduzione di indagini epidemiologiche e di tipizzazione per differenti microrganismi patogeni, molto spesso in associazione con altri metodi molecolari (81-91).

#### *Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR)*

La rep-PCR si basa sull'amplificazione di sequenze ripetute non codificanti naturalmente presenti nel DNA genomico di molti microrganismi (gram-positivi e gram-negativi) in elevato numero di copie altamente conservate. I primers di PCR vengono disegnati sulla base di questi elementi e permettono l'amplificazione delle regioni di DNA compresi fra i primers. Quando due elementi ripetuti sono situati sufficientemente vicini l'uno rispetto all'altro, la regione intermedia verrà amplificata (92, 93). Dopo la PCR, gli ampliconi vengono separati su gel di agarosio generando un "fingerprinting" tipico per ogni isolato.

Sono state studiate diverse versioni di rep-PCR che differiscono, sostanzialmente, per la tipologia di sequenze ripetute utilizzate nell'analisi. Nella versione REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR) gli elementi ripetuti di DNA sono rappresentati da corti frammenti (33-40 paia di basi),

presenti da 500 a 1000 copie per genoma con sequenza palindromica (ovvero la sequenza nucleotidica può essere letta con lo stesso significato sia in un senso sia in quello opposto), che fungono da target per numerose specie batteriche (94, 95). Tale metodica, inizialmente adoperata per lo studio di *E. coli* e altri enterobatteri (96), è attualmente utilizzata per la tipizzazione di un gran numero di microrganismi patogeni come *Clostridium difficile*, *Shigella* spp., *S. aureus*, *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA), *P. aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *C. jejuni* e *C. coli*, *L. monocytogenes* (41, 97-104), e nello studio dell'epidemiologia dei microrganismi patogeni a trasmissione alimentare (94). La variante ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR) include sequenze composte da 124-127 bp, presenti da 30 a 50 copie per genoma, regioni altamente conservate e presenti nel DNA di *E. coli*, *Salmonella* e altri enterobatteri (105, 106). Essa è stata utilizzata per lo studio di *S. aureus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Bacillus thuringiensis*, *Shigella* spp., *V. parahaemolyticus*, *Campylobacter* spp. ed altri microrganismi patogeni (91, 107-111). Un'altra variante è la BOX-PCR che prevede l'utilizzo di sequenze ripetute definite BOX; tali elementi sono composti dalla combinazione di tre diverse subunità (BoxA, BoxB e BoxC) presenti in differenti combinazioni (112) e la cui lunghezza è pari, rispettivamente, a 59, 45 e 50 bp. Sono state identificate per la prima volta nel batterio gram-positivo *Streptococcus pneumoniae* (113) e successivamente utilizzate per lo studio di altri microrganismi patogeni come *Aeromonas hydrophila* e *C. jejuni* (104, 114).

I vantaggi relativi all'applicazione di tali tecniche sono i tempi relativamente brevi per ottenere i risultati, richiedono minime quantità di DNA, possono essere utilizzati per tipizzare molti microrganismi patogeni, sono economiche, hanno un alto grado di tipizzazione ed un potere discriminante ti-

picamente buono anche rispetto ad altre metodiche come la PFGE e l'MLST (104).

Un grande svantaggio della rep-PCR è la moderata riproducibilità che può scaturire da variabilità nei reagenti utilizzati e nei sistemi elettroforetici, determinando la produzione di risultati differenti (115) (Tabella 1). Attualmente è disponibile, in commercio, un sistema semi-automatizzato (Diversilab, bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) che aumenta la riproducibilità e la standardizzazione del metodo rispetto ai sistemi manuali (116). In un'indagine epidemiologica, tuttavia, l'utilizzo di tale sistema può risultare limitato al semplice screening degli isolati, in quanto richiede un'abilità tecnica e genera difficoltà nell'interpretazione visiva dei profili molecolari; inoltre, risulta non economico, caratteristica tipica della modalità manuale (117, 118). Per ovviare a tali inconvenienti, è opportuno, pertanto, confrontare i risultati con altre tecniche molecolari (102, 103).

#### *High Resolution Melting analysis (HRM)*

L'analisi HRM è una metodica di genotipizzazione innovativa che facilita l'individuazione di mutazioni. Viene utilizzata per la caratterizzazione di campioni di DNA in base al loro comportamento durante la dissociazione (fase di melting) del doppio filamento che si verifica con l'aumento della temperatura e rileva la presenza di mutazioni puntiformi.

Consiste in una fase di amplificazione del gene di interesse mediante Real-time PCR seguita dalla denaturazione degli ampliconi in presenza di un fluoroforo intercalante di terza generazione (SYTO9, EvaGreen, LC Green) che permette la saturazione totale del DNA senza inibire la reazione di PCR (la saturazione impedisce fenomeni di riallocazione del fluoroforo durante la fase di melting). L'HRM rileva il cambiamento nella fluorescenza, che avviene durante la fase di dissociazione con incremento della temperatura, da DNA a doppio filamento a

DNA a singolo filamento. Quando piccoli frammenti di DNA vengono sottoposti a incrementi di temperatura si denaturano poiché le interazioni tra nucleotidi opposti nella doppia elica vengono meno. A seconda della lunghezza del frammento e della percentuale in GC, si ha una temperatura tipica, indicata appunto come temperatura di melting o  $T_m$ , che corrisponde al punto in cui la frazione di molecole native è uguale alla frazione di molecole dissociate. La  $T_m$  è inferiore in presenza di una non totale complementarietà fra le due sequenze (mismatch) rispetto ad una complementarietà perfetta (Fig.1). L'HRM può essere potenzialmente utilizzata per analizzare tutti i tipi di variazione di sequenza del DNA, inclusi cambiamenti di singole basi, inserzioni, delezioni e sostituzioni di coppie di basi; inoltre, permette di determinare variazioni nelle sequenze di DNA senza l'utilizzo del sequenziamento e delle procedure di ibridazione (119-122).

Recentemente sono stati pubblicati lavori scientifici relativi all'applicazione di HRM per la tipizzazione del gene che codifica per la flagellina in *C. jejuni* e *C. coli* (*flaA* gene) (123) ma anche per lo studio di *B. cereus* (124), *L. monocytogenes* (125) e ed è stata dimostrata la sua validità come strumento importante per lo sviluppo di saggi molecolari diagnostici rapidi per la valutazione delle mutazioni per la resistenza ai farmaci in isolati clinici di *M. tuberculosis* (126).

#### *Loop-Mediated Isothermal Amplification analysis (LAMP)*

Negli ultimi tempi è stato sviluppato un nuovo metodo di amplificazione degli acidi nucleici, denominato Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP), economico, rapido, altamente specifico e facile nell'esecuzione. Tale tecnica prevede l'utilizzo di una DNA polimerasi ed una serie di quattro primers appositamente disegnati che riconoscono un totale di sei distinte sequenze sul DNA bersaglio; la reazione procede in condizioni isoterme. Tale metodica pre-

senta diversi vantaggi in quanto non richiede l'utilizzo di apparecchiature costose ed, inoltre, prevede meno passaggi di preparazione rispetto alla PCR convenzionale ed ai saggi di Real-time PCR. È stata ampiamente utilizzata per l'identificazione di differenti microrganismi patogeni (127).

### ***C) Metodi basati su restrizione enzimatica seguita da amplificazione genica***

Tali metodi molecolari prevedono una fase di digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione seguita da una fase di amplificazione; tutto ciò permette di effettuare la classificazione dei microrganismi in base al profilo molecolare dei frammenti generati. Le tecniche che rientrano in questo gruppo sono: l'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) e la Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP).

#### *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)*

L'AFLP, descritta per la prima volta da Vos *et al.* nel 1995 (128), è una tecnica di tipizzazione che combina l'accuratezza dell'analisi dell'RFLP con la precisione della PCR; entrambe queste caratteristiche rendono il metodo altamente sensibile per la determinazione dei polimorfismi genomici. È una tecnica di tipizzazione che può essere utilizzata per lo studio dell'epidemiologia dei batteri gram-positivi e gram-negativi e permette di amplificare i frammenti prodotti da enzimi di restrizione senza alcuna conoscenza preliminare delle sequenze nucleotidiche del DNA target.

Tale metodo di tipizzazione prevede tre diverse fasi operative: nella prima si effettua la digestione del DNA genomico con uno o due enzimi di restrizione, seguita da una "ligation", ai frammenti generati, di un oligonucleotide a doppia elica ("adaptor") che, tranne che per una coppia di basi, ha una sequenza complementare al sito ricono-

sciuto dall'enzima di restrizione utilizzato (la presenza di una coppia di basi differenti impedisce la ricomposizione della sequenza originale del sito di restrizione dopo la "ligation"); nella seconda fase si esegue l'amplificazione selettiva dei frammenti, mediante PCR, usando primers costituiti da una sequenza omologa agli adattatori ed al sito di restrizione e una estensione da uno a tre nucleotidi addizionali che conferiscono la selettività desiderata; nella terza fase, invece, i frammenti amplificati vengono separati e visualizzati mediante elettroforesi su gel (129, 130).

L'AFLP mostra una grande flessibilità nel numero di loci che possono essere co-amplificati simultaneamente in una reazione di PCR visualizzati in funzione della complessità del genoma, dei primers utilizzati e della risoluzione dell'elettroforesi su gel. La disponibilità di sistemi automatizzati che combinano il sequenziamento genico e l'analisi dei frammenti ha consentito di sviluppare un sistema di AFLP (Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism - F-AFLP) basato sull'elettroforesi di frammenti marcati, separabili con elettroforesi capillare o su gel verticale ad alta risoluzione e analizzabili mediante lettura al laser. I vantaggi di tale approccio sono un risparmio di tempo (che può tradursi anche in minor costo), una maggiore accuratezza nell'analisi dei frammenti, un maggior numero di informazioni (frammenti) analizzabili e un sistema di lettura molto accurato (131).

L'origine dei polimorfismi di AFLP può essere attribuita a differenti cause, tra cui mutazioni nel genoma o nel sito target, con creazione o scomparsa di uno o più siti di restrizione; inoltre, la distribuzione dei siti di restrizione nel genoma è variabile, per cui ogni ceppo genera un profilo caratteristico.

L'AFLP mostra una serie di vantaggi come l'alto grado di tipizzazione, buona riproducibilità, specialmente se vengono utilizzate procedure standardizzate (incluse le apparecchiature); richiede, inoltre, minori

quantità di DNA, è poco costosa e può essere automatizzata (Tabella 1).

Analogamente ad altre tecniche di tipizzazione molecolare può contribuire a identificare epidemie di ampia portata spazio-temporale, stabilendo relazioni tra casi apparentemente sporadici, individuando le sorgenti di infezione nei focolai d'infezione. Inoltre, si rivela utile per studi tassonomici, in quanto contribuisce ad ampliare le conoscenze sulla struttura genetica della popolazione e sull'ecologia del microorganismo.

Tale tecnica è stata utilizzata nello studio di numerosi microrganismi patogeni come *E. coli* O157, *Salmonella*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes*, *L. pneumophila*, *Clostridium perfringens* e *B. cereus* (131-142).

#### *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)*

La PCR-RFLP è una variante del metodo tradizionale di RFLP e consiste nell'amplificazione, mediante PCR, di specifiche sequenze del DNA genomico seguita da digestione degli amplificati con un enzima di restrizione; i frammenti risultanti vengono poi separati e visualizzati in un gel di agarosio come un profilo di bande (Fig. 1).

Tale metodo è semplice, rapido e utile per la determinazione di polimorfismi genetici presenti sia nel locus amplificato (inserzioni, delezioni, ricombinazioni, etc.), sia nei siti di restrizione dell'enzima. Per ottenere dei buoni risultati, il gene amplificato dovrebbe possedere regioni conservate del DNA che fiancheggiano sequenze variabili per permettere di visualizzare eventuali differenze mediante digestione dell'amplificato (9, 11). Poiché spesso l'informazione genetica deriva da un singolo locus, il potere discriminante di tale tecnica risulta limitato. Tuttavia, l'applicazione della PCR-RFLP elimina alcuni inconvenienti connessi all'uso dell'RFLP in quanto, essendo un metodo di

genotipizzazione basato su PCR, può essere utilizzato per l'analisi di DNA isolato direttamente da campioni umani e ambientali ed, inoltre, è possibile separare e visualizzare direttamente il ridotto numero di frammenti generati per digestione degli amplificati di PCR, eliminando la necessità dell'ibridazione con sonde (28).

Tale metodica è stata frequentemente utilizzata per lo studio di *Campylobacter* spp. mediante l'analisi del gene *flaA* (139, 143) ed altri microrganismi patogeni come *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Brucella* spp., *M. tuberculosis* e *Cryptosporidium* spp. (144-148).

#### **D) Metodi basati sul sequenziamento del DNA**

Il sequenziamento è una tecnica molecolare molto utile per lo studio dei polimorfismi nelle sequenze geniche che presentano sequenze variabili e conservate. Il vantaggio più significativo della genotipizzazione mediante sequenziamento, rispetto ai metodi basati sull'analisi di profili di bande, è l'elevata riproducibilità poiché si basa su sequenze ben definite che possono essere conservate in database online e confrontati con altri laboratori. GenBank, il più ampio database delle sequenze di DNA, conserva enormi quantità di sequenze genomiche, come anche sequenze specifiche per locus per tutti i batteri noti ed è quello più frequentemente utilizzato (Tabella 2).

Allo stato dell'arte, sono disponibili differenti strategie di sequenziamento del DNA differenziati in metodi tradizionali o di "prima generazione" (metodo Sanger, anche noto come dideoxi-sequenziamento o sequenziamento di DNA a terminazione di catena) e metodi di "seconda generazione" (Next-Generation Sequencing, NGS) (pirosequenziamento, tecnologie Roche/454; metodo Sanger modificato, Illumina/Solexa; sequenziamento mediante ligation e ibridizzazione, Applied Biosystems "SOLiD").

### *Metodo Sanger*

In questo metodo, la sequenza di un singolo filamento di DNA stampo viene determinata usando una DNA polimerasi che permette di sintetizzare un insieme di frammenti polinucleotidici di lunghezza differente in quanto nella miscela di reazione vengono inseriti dei dideossinucleotidi (ddNTPs) che, non possedendo più il gruppo 3'-OH (2-3 dideossiribosio), interrompono la fase di allungamento del DNA (vengono, infatti, definiti nucleotidi "terminator") e determinano la produzione di frammenti "monchi" (<http://www.youtube.com/watch?v=vK-HIMainE>) (149).

Dalla sua descrizione, avvenuta per la prima volta nel 1974, il metodo Sanger è quello più utilizzato per il sequenziamento, sebbene negli ultimi anni sia stato in parte sostituito da nuovi metodi di seconda generazione molto più efficienti ed economici (28).

Mentre agli esordi il sequenziamento veniva effettuato eseguendo le diverse fasi in maniera separata, attualmente, con l'avvento dei sequenziatori automatici (Automated Sanger sequencer, ABI3730xl, Applied Biosystems, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) la reazione è effettuata automaticamente senza l'intervento dell'operatore, in un'unica miscela, etichettando ogni base azotata con una molecola fluorescente di colore diverso. La sequenza letta viene immediatamente trasferita ad un computer e visualizzata in grafico sotto forma di un elettroferogramma, dove ad ogni diverso colore corrisponde una diversa base nucleotidica (<https://www.youtube.com/watch?v=lnAcViYsz4g>).

### *Pirosequenziamento*

Rispetto al metodo Sanger, tale metodo si basa sulla determinazione quantitativa, in tempo reale, del pirofosfato rilasciato in seguito all'aggiunta di un nucleotide in una catena crescente di DNA durante la sua sintesi. Tale metodica sfrutta la capacità della luciferasi di emettere luce, in maniera proporzionale al numero di nucleotidi incor-

porati durante la polimerizzazione del filamento complementare allo stampo, evitando la classica elettroforesi (150). La quantità di luce è proporzionale al pirofosfato rilasciato durante l'incorporazione del nucleotide (per esempio, se vengono incorporati due nucleotidi uguali, la luce generata sarà il doppio di quella ottenuta in seguito all'incorporazione di un singolo nucleotide) e quelli non incorporati vengono idrolizzati dall'apirasi, un enzima presente nella miscela di reazione. Ad oggi, il pirosequenziamento è stato usato per diverse applicazioni di genotipizzazione, come il sequenziamento di regioni altamente polimorfiche nel gene 16S rRNA, e risulta un approccio rapido e poco costoso per l'identificazione e la differenziazione dei batteri (151).

Nel 2004, la Roche ha commercializzato per prima volta un sequenziatore automatico (454 GenomeSequencer FLX instrument-Roche Applied Science, [www.rocheappliedscience.com](http://www.rocheappliedscience.com); <http://www.youtube.com/watch?v=bFNjxKHP8Jc>; <http://454.com/products/technology.asp>) che, sfruttando la tecnologia del pirosequenziamento, è in grado di assicurare, con una singola corsa, la lettura multipla e parallela di oltre un milione di singoli frammenti di DNA di lunghezza media compresa fra 400 e 500 bp (sebbene oggi sia possibile leggere anche frammenti più lunghi) con un'elevata accuratezza (>99,5%), producendo, in un singolo esperimento, la lettura di circa 500 milioni di paia di basi in poche ore.

Il sistema si basa sostanzialmente sul legame di frammenti di DNA, saldati tramite adattatori, a nanosfere che fungono da nanoreattori in quanto, dopo una reazione di PCR, viene generata localmente una "genoteca" del frammento target. Ogni nanosfera/genoteca viene poi deposta in un pozzetto di uno speciale chip a fibre ottiche (PicoTiterPlatein) cui viene successivamente inserita una miscela di reazione composta da DNA polimerasi, trifosfati ed altri enzimi (sulfurilasi, apirasi, luciferasi) al fine di



realizzare il sequenziamento. In ogni ciclo tutto il chip viene scansionato da un CCD (Charge-Coupled Device, - dispositivo ad accoppiamento di carica) che registra i segnali luminosi corrispondenti alle basi inserite. La sequenza di DNA templatato è determinata da un "pirogramma" che corrisponde all'ordine di nucleotidi corretti che sono stati incorporati (152).

#### *Metodo Sanger modificato*

Più recentemente, Illumina/Solexa (<http://www.illumina.com/>) ha sviluppato un pirosequenziatore che permette di clonare frammenti di DNA senza amplificazione utilizzando oligonucleotidi fissati su un vetrino ("flow cell") e complementari a specifici adattatori precedentemente ligati a frammenti di DNA. Successivamente, le molecole piegandosi si ibridizzano con adattatori complementari (creazione di un "ponte"- bridge amplification), formando così il modello utile per la sintesi dei loro filamenti complementari. Dopo la fase di amplificazione, in ogni cella di flusso vengono prodotti oltre 40 milioni di cluster, ciascuno composto da circa 1000 copie di frammenti di DNA a singolo filamento. Il sequenziamento successivo viene effettuato mediante la sintesi del DNA (come per il metodo Sanger) utilizzando una miscela di reazione contenente i primers, i quattro nucleotidi terminatori reversibili (differenti da quelli utilizzati nel metodo Sanger che sono irreversibili), ciascuno marcato con un colorante fluorescente differente, e una DNA polimerasi modificata in grado di incorporare i terminatori nella catena oligonucleotidica in crescita. Con questo metodo è possibile monitorare, pertanto, in tempo reale, l'aggiunta di tutti i nucleotidi su ogni frammento, fotografando le fluorescenze emesse a ogni passaggio da tutte le molecole di DNA depositate sul vetrino (<http://www.youtube.com/watch?v=199aKKHcxC4>). Tale sistema può generare oltre 1 Gbp di dati di sequenza (sequenze di lunghezza pari a

30-40bp) con un'accuratezza superiore al 99% (152, 153).

#### *Sequenziamento mediante "ligation" e ibridizzazione*

Ultimamente è stato individuato un ulteriore sistema di sequenziamento (ABI/SOLiD-Applied Biosystems- Supported Oligonucleotide Ligation and Detection, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) che utilizza un processo di sequenziamento basato sull'utilizzo di una DNA ligasi (e non DNA polimerasi come si verifica nelle altre applicazioni) che catalizza l'unione di frammenti di DNA anziché sintetizzarne di nuovi. Tale sistema segue, nelle prime fasi, una procedura simile al sequenziamento 454 della Roche (frammentazione, aggiunta di adattatori, amplificazione in emulsione) tranne la parte terminale in cui il sequenziamento avviene per ibridizzazione e unione ("ligation") sequenziale di 16 combinazioni di dinucleotidi a sequenza nota marcati con quattro fluorocromi differenti (ogni colorante utilizzato marca quattro differenti dinucleotidi); il risultato è una sequenza di "colori" ciascuno dei quali rappresenta uno specifico dinucleotide. Utilizzando uno schema di codifica dei quattro fluorocromi, ogni posizione viene, effettivamente, esaminata due volte, e l'identità del nucleotide viene determinata dall'analisi del colore che si intercala in due successive reazioni di "ligation" e consente di leggere due volte lo stesso nucleotide, il che abbassa di molto la possibilità di commettere errori (<http://www.youtube.com/watch?v=nlvyF8bFDwM>; <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Next-Generation-Sequencing.html>). Può generare fino a 3 Gbp di dati di sequenza (sequenze di lunghezza pari a 30-35bp) con un'accuratezza superiore al 99% (152).

Un ulteriore approccio al sequenziamento è quello relativo all'applicazione di una nuova tecnologia di sequenziamento, Ion Tor-

rent (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Semiconductor-Sequencing/Applications-Semiconductor-Sequencing.html>), che si basa sul rilevamento di variazioni di pH che si verificano quando una base nucleotidica viene incorporata nella molecola di DNA; in particolare, ogni volta che un nucleotide viene aggiunto alla catena di DNA, si ha la perdita di uno o più ioni idrogeno a seconda della base incorporata e quindi lo strumento rileva i cambiamenti di pH associandoli ad una base specifica (<http://www.youtube.com/watch?v=MxkYa9XCvBQ>).

Le principali tecniche molecolari che si basano sul sequenziamento del DNA sono: la Single-Locus Sequence Typing (SLST), la Multi-Locus Sequence Typing (MLST), la Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) analysis e la Multiple-Locus VNTR analysis (MLVA).

#### *Single-Locus Sequence Typing (SLST)*

Tale metodica viene utilizzata per la determinazione delle relazioni tra isolati batterici in base al confronto delle variazioni di sequenza in un singolo gene target contenente sufficienti informazioni epidemiologicamente rilevanti. Essa prevede una fase iniziale di selezione dei loci seguita da amplificazione, sequenziamento e confronto con database di riferimento (Fig. 1).

Di seguito sono riportate alcune delle più importanti applicazioni.

Tipizzazione della proteina M (*emm*-typing) per *Streptococcus pyogenes*.

La proteina M, presente sulla superficie cellulare di *S. pyogenes* è un importante fattore di virulenza dotato di potere immunogeno (154). L'analisi genomica ha rivelato che il gene della proteina M (*emm*) è un complesso di più di 20 geni (superfamiglia) e può codificare circa 100 differenti tipi di proteine M. In questi ultimi anni, la classica tipizzazione sierologica è stata sostituita dal

sequenziamento della regione ipervariabile del gene *emm*, collocata all'estremità 5', diventando il gold standard nelle indagini epidemiologiche e per i sistemi di sorveglianza. Tuttavia, per discriminare completamente i cloni GAS (Streptococco del gruppo A), la tipizzazione del gene *emm* dovrebbe essere integrata con altri metodi di tipizzazione, come la PFGE o MLST (155, 156).

Sequenziamento della regione polimorfica X del gene della proteina A (*spa*) di *S. aureus*. La tipizzazione molecolare degli isolati di *S. aureus*, basata sul polimorfismo del gene della proteina A (*spa*), è stata la prima tra i metodi molecolari basati sull'analisi delle sequenze ripetute (157). In tale metodo, ad ogni sequenza ripetuta è associato un codice ed ogni *spa*-tipo è dedotto dall'ordine specifico ripetuto. Sebbene il metodo possieda un potere discriminante inferiore rispetto alla PFGE, i bassi costi, la facilità d'uso e velocità d'esecuzione, come anche l'eccellente riproducibilità e la disponibilità di banche dati (<http://spaserver.ridom.de/>) lo rendono attualmente molto utile per la caratterizzazione degli isolati di *S. aureus* a livello locale, nazionale e internazionale (158).

Sequenziamento del gene *fla*-SVR (Short Variable Region) di *Campylobacter* spp.

La sequenza nucleotidica della breve regione variabile (SVR) del gene della flagellina (*fla*) fornisce informazioni adeguate per lo studio di epidemiologia di *Campylobacter* spp. (159). Sebbene la PFGE rimanga il metodo di scelta per la caratterizzazione di *Campylobacter* spp., tuttavia, alcuni Autori hanno dimostrato che, il sequenziamento della breve regione variabile del gene B della flagellina (*flaB*) risulti uno strumento più rapido, riproducibile, stabile e con un potere discriminante maggiore rispetto all'MLST e comparabile alla PFGE (160, 161).

#### *Multi-Locus Sequence Typing (MLST)*

L'MLST è stato uno dei primi metodi di tipizzazione basati sul sequenziamento. Il primo schema è stato sviluppato nel 1998 per

la *Neisseria meningitidis* (162) e da allora è diventato uno dei metodi molecolari più utilizzato per le indagini epidemiologiche e gli studi sull'evoluzione molecolare di molti microrganismi patogeni e non patogeni (163-173). È adatto per indagini a lungo termine, specialmente quando bisogna tipizzare una specie microbica con un alto tasso di ricombinazione genetica, e consiste nell'analisi dei polimorfismi presenti in geni "housekeeping" (lunghi circa 500 paia di basi), che codificano per enzimi che catalizzano importanti funzioni metaboliche. Sono selezionati in funzione della loro posizione nel genoma, della possibilità di disegnare primers adatti per la loro amplificazione e per la diversità tra le sequenze (Fig. 1) (174).

Un aspetto importante dell'MLST è rappresentato dalla possibilità di misurare la ricombinazione genetica tra ceppi batterici, caratteristica che è alla base della dinamicità, in termini evolutivi, di una popolazione batterica; infatti, quando vi è passaggio di materiale genetico tra linee clonali diverse, si creano nuovi genotipi che si adattano meglio a particolari condizioni ambientali o a specifici ospiti. Nella valutazione delle relazioni esistenti tra isolati, l'analisi dei dati di MLST può essere effettuata utilizzando due metodi: quello basato sull'analisi delle variazioni alleliche (*allele-based methods*) e sulle variazioni nucleotidiche (*nucleotide-based methods*).

La prima modalità (*allele-based methods*) è generalmente utilizzata nell'analisi dei microrganismi non-clonali (ad esempio *Helicobacter pylori*) e funziona bene se il meccanismo predominante di variazione tra i ceppi è la ricombinazione, indipendentemente dal numero di nucleotidi coinvolti in ogni cambiamento allelico. Ciascuno stipite viene codificato con una serie numerica in cui ogni numero corrisponde al tipo di allele presente per ognuno dei loci considerati. Ad ogni locus, di ognuno dei geni selezionati, si assegna un numero in funzione del tipo di sequenza presente e la sequenza dei numeri

rappresenta la formula allelica o profilo allelico del ceppo (sequence type-ST) (175). Gli isolati batterici che presentano lo stesso profilo allelico possono essere considerati correlati dal punto di vista clonale.

Il secondo metodo (*nucleotide-based methods*), invece, viene utilizzato per lo studio di microrganismi clonali (per esempio *S. aureus*) in cui la ricombinazione è rara o assente e, pertanto, i metodi di analisi clonale risulterebbero, probabilmente, fuorvianti, in quanto batteri strettamente correlati che possiedono una variazione di una singola base in più loci appaiono tanto diversi quanto quelli che hanno mutazioni multiple nello stesso numero di loci. Per questi microrganismi è, pertanto, preferibile analizzare le sequenze nucleotidiche o come loci singoli o come sequenze concatenate contenenti tutti i loci (176, 177).

Una variante dell'MLST è il metodo Multilocus Ribosomal Sequence Typing (rMLST) che permette di valutare la variazione molecolare dei 53 geni che codificano per le proteine batteriche delle subunità ribosomali (178). Questo nuovo metodo ha uno schema simile all'MLST; i dati prodotti possono essere facilmente accessibili e sistemati nel database di BIGS<sub>DB</sub> (Bacterial Isolate Genome Sequence Database), non è richiesto un genoma di riferimento, loci target sono conservati nel dominio batterico e non è richiesta la rianalisi degli alleli esistenti (179). Anche se più costoso, l'rMLST offre una risoluzione migliore rispetto alle precedenti metodologie che, insieme alla riduzione dei costi del sequenziamento del DNA, la rendono un tecnica promettente; tale metodo, tuttavia, richiede ancora ulteriori approfondimenti.

Grazie alla buona riproducibilità e trasferibilità dei dati di MLST è stato possibile sviluppare, a livello mondiale, delle banche dati, facilmente accessibili a tutti, che permettono l'identificazione dei tipi allelici e dei genotipi degli isolati testati. Questi sistemi sono fondamentali per studi evolutivi

di popolazione ma si sono rivelati efficaci anche per analisi di focolai epidemici (180, 181). Attualmente sono disponibili database MLST (MLSTdbNET) di circa 79 microrganismi e permettono l'identificazione ed il confronto di una sequenza allelica, l'identificazione ed il confronto di un profilo allelico ed un confronto degli isolati (Tabella 2). Il sito nazionale PubMLST fornisce l'accesso al database MLSTdbNET, ma anche ad un database sviluppato di recente, ossia il BIG-S<sub>DB</sub>, un software progettato per memorizzare e analizzare i dati di sequenza di isolati batterici confrontandoli, anche, con dati fenotipici (179). Questi database forniscono anche software on-line (eBURST, Based Upon Related Sequence Types) per la determinazione della relazione genetica tra i ceppi batterici all'interno di una specie, nonché mappe- MLST che servono per tracciare gli isolati di ogni ST nei vari Paesi che li hanno caratterizzati (182). Il software eBURST, tenendo conto dei profili allelici dei ceppi, permette di dividere gli isolati in complessi clonali (CC) che contengono isolati con un alto livello di similarità genetica; pertanto, isolati di differenti complessi clonali sono meno correlati rispetto ad altri che fanno parte dello stesso complesso clonale.

Un metodo di tipizzazione molecolare, basato sul funzionamento dell'MLST, è l'SBT (Sequence-Based Typing) utilizzato per la caratterizzazione molecolare dei ceppi di *L. pneumophila* sg 1 (183). Esso si basa sul sequenziamento degli ampliconi di alcuni geni "non-housekeeping" (generalmente sette); la variabilità allelica in tali geni consente di definire un ceppo batterico attraverso un codice numerico unico. Tale codice viene poi utilizzato per interrogare la banca dati dello EWGLI (European Working Group for Legionella Infections - Gruppo Europeo di Lavoro sulla Legionellosi, attualmente parte della rete di sorveglianza della legionellosi europea - ELDSnet-European Legionnaires' Disease Surveillance Network - coordinata dall'European Centre for Disease Prevention

and Control - ECDC, Stoccolma/Svezia), e definire le varianti alleliche dei ceppi ad oggi isolati e caratterizzati.

L'MLST presenta, tuttavia, alcuni svantaggi come la necessità di avere a disposizione un genoma di riferimento per la selezione dei loci, la difficoltà di applicare il metodo per microrganismi patogeni privi di una diversità nell'intero genoma o dei geni housekeeping, il costo elevato e la laboriosità del metodo, come anche il potere discriminante che risulta variabile a seconda del gene che viene utilizzato (184-186).

#### *Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) Analysis e Multiple-Locus VNTR Analysis (MLVA)*

Il sequenziamento del DNA genomico ha permesso di evidenziare la presenza, in molti batteri, di regioni ripetute. Queste sequenze variano sia per la lunghezza (da alcune basi a più di 100 coppie di basi) sia per il numero di copie di ciascuna sequenza ripetuta che può essere altamente variabile, anche tra ceppi della stessa specie (187-189). Sfruttando la presenza nel genoma di tali elementi è stato possibile sviluppare dei saggi di tipizzazione che si basano sull'analisi della variazione del numero di sequenze ripetute in *tandem* definite VNTR (Variable Number Tandem Repeats - sequenze ripetute in tandem) utili per differenziare isolati non clonali (190, 191). L'analisi delle sequenze ripetute, che permette di evidenziare le differenze nel numero di copie presenti tra ceppi differenti, viene definita MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) (192).

A partire dal 2000, sono stati sviluppati differenti protocolli di MLVA per la genotipizzazione di diversi microrganismi patogeni, soprattutto per lo studio di eventi epidemici (191).

Per disegnare i protocolli VNTR/MLVA, bisogna necessariamente analizzare l'intera sequenza del genoma del microrganismo da testare per identificare le possibili sequenze ripetute e per far ciò si possono utilizzare

software dedicati (Tabella 2) (190, 193) che permettono di analizzare l'intera sequenza del genoma del microrganismo da testare ed identificare le sequenze ripetute; successivamente si procede a disegnare i primers di PCR, sulla base della regioni fiancheggianti la sequenza ripetuta, e ad amplificare le regioni interne variabili; dopo amplificazione, i prodotti di PCR vengono separati e ne viene determinata la dimensione ed il numero. La variazione nel numero degli amplificati ottenuti riflette la diversità genetica all'interno della specie.

Con tale tecnica è possibile utilizzare primers marcati con differenti fluorofori (permettendo l'analisi simultanea di più loci) e separare gli ampliconi con elettroforesi capillare in un sequenziatore automatizzato; ciò permette di analizzare gli ampliconi MLVA in un'unica corsa. Le molecole dei differenti fluorofori, incorporati negli ampliconi, assorbono l'energia laser e rilasciano una luce di lunghezza d'onda diversa, che viene poi rilevata dal sequenziatore. L'utilizzo di un software dedicato, permette, poi, di leggere tutti i loci in un elettroferogramma generando automaticamente il numero di ripetizione per ogni locus (Fig. 1).

Questo metodo di tipizzazione presenta alcuni vantaggi come la facilità nell'esecuzione, la rapidità, economicità ed alta riproducibilità ma anche alcune limitazioni. Esso, infatti, non è universale, bensì altamente specifico in quanto, per ciascuna specie patogena studiata devono essere disegnati primers specifici (e questo è il motivo principale per cui, in generale, non può sostituire la PFGE negli studi epidemiologici) e non sono ancora disponibili test standardizzati per tutti i microrganismi patogeni; in Europa, infatti, è attualmente disponibile un test MLVA standardizzato solo per *Salmonella enterica* sottospecie *enterica* sierotipo Typhimurium (105, 194). È comunque un metodo altamente discriminante, tanto da essere attualmente utilizzato come metodo di riferimento per la tipizzazione di molti microrganismi patogeni.

### *Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Analysis*

Permette di individuare i polimorfismi presenti in sequenze specifiche di DNA, in base al cambiamento di una singola base nucleotidica (Single-Nucleotide Polymorphisms-SNPs). Inizialmente utilizzata per lo studio della genetica delle cellule eucariotiche, per l'identificazione di geni associati ad alcune patologie, è oggi anche adoperata per la caratterizzazione e la differenziazione di ceppi batterici (195, 196). Dopo un evento mutazionale, molti SNPs possono persistere nel genoma batterico ed essere utilizzati per distinguere isolati strettamente correlati. L'individuazione degli SNPs può essere effettuata utilizzando differenti metodi: mediante sequenziamento (metodo tradizionale o pirosequenziamento) della regione di DNA in cui corti frammenti, contenenti il locus SNP, sono sequenziati e comparati per evidenziare la presenza di un nucleotide sostituito, mediante saggi di Real-time PCR che, grazie all'utilizzo di sonde ibridizzate, permettono di evidenziare SNPs sulla base dell'efficienza del legame tra sonda e sequenza nucleotidica studiata (197) o mediante microarray. Con il termine "microarray" si intende la disposizione ordinata, su un idoneo supporto, di sonde che consentono il legame specifico di sequenze complementari. Le singole sonde sono legate al supporto su piccole aree circolari che rappresentano un elemento della matrice. Il funzionamento delle matrici si basa, sostanzialmente, sull'interazione del legame che si crea tra biomolecole, ossia tra le sonde fissate alla matrice e le molecole ad esse complementari (definite target) opportunamente marcate. Le sonde più importanti sono quelle a DNA (microarray a DNA) e trovano un diverso impiego in quanto possono essere utilizzate, oltre che per riconoscere la presenza di una o più mutazioni all'interno di una sequenza genica conosciuta, anche per lo studio di profili di espressione genica e per l'analisi genotipica di microrganismi patogeni, uti-

lizzando matrici contenenti sonde composte da geni housekeeping, di virulenza e associati all'antibiotico-resistenza (198-200). In base alla lunghezza delle sonde, è possibile distinguere due diverse tipologie di matrici: quelle a cDNA (DNA retrotrascritto da uno specifico mRNA) e quelle a oligonucleotidi. Le prime vengono ottenute deponendo su un vetrino singole sonde, ciascuna costituita da uno specifico clone di cDNA e risultano a bassa densità di schieramento (100-500 geni), mentre le seconde sono costituite da sonde a singola elica (30-70 nucleotidi) spot-tate o direttamente sintetizzate in alta densità su un substrato solido (più di 1.000.000 di oligonucleotidi per array). Mentre l'utilizzo delle matrici a cDNA permette di evidenziare soltanto la presenza/assenza di un particolare gene, con le matrici a oligonucleotidi è possibile individuare SNPs e delezioni di sequenze corte, dividendo la sequenza di un gene in un determinato numero di sonde oligonucleotidiche.

## Selezione del metodo e interpretazione dei risultati

### Selezione del metodo

La scelta del metodo (o dei metodi) di genotipizzazione più appropriato, rappresenta uno degli aspetti fondamentali che influenzano in maniera determinante il risultato di un'indagine e dipende dal contesto epidemiologico in cui il metodo sarà utilizzato e da altri fattori non trascurabili come tempo di esecuzione, costi, strumentazioni e disponibilità di personale qualificato. Tale scelta può variare anche in base al livello geografico di applicazione delle tecniche molecolari (locale, come i presidi ospedalieri e le strutture sanitarie; regionale e nazionale, come i laboratori di riferimento ed i centri di ricerca; internazionale, come i network). In particolare, nei laboratori di epidemiologia molecolare clinica, dove la genotipizzazione può risultare utile per lo studio dell'em-

genza di alcuni patogeni nosocomiali ("alert organisms"), soprattutto nei reparti che ospitano pazienti a più alto rischio, le tecniche molecolari più comunemente utilizzate sono la PCR e la PFGE, mentre trova scarsa applicazione il sequenziamento genico (6, 201-203). Differente è, invece, la scelta relativa al metodo idoneo per le indagini condotte a livello nazionale, il cui obiettivo principale è quello di creare reti di sorveglianza epidemiologica per il monitoraggio e controllo delle infezioni. Nei laboratori in cui si eseguono le indagini, vengono utilizzati metodi standardizzati e riproducibili e che permettono di ottenere dati facilmente trasferibili e accessibili a tutti, sia a livello nazionale sia internazionale. Un esempio di sistema di sorveglianza nazionale è l'ENTER-NET (Enteric Pathogen Network) Italia, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), Roma, che coinvolge numerosi laboratori del Servizio Sanitario Nazionale e si occupa della sorveglianza delle infezioni da *Salmonella*, *E.coli* O157 ed altri *E.coli* produttori di Vero-citotossina (VTEC), *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella* e *Yersinia*; i dati raccolti vengono regolarmente inviati all'ECDC attraverso il sistema TESSy. A livello internazionale, invece, ENTER-NET è il sistema di sorveglianza europeo delle infezioni da *Salmonella*, *E.coli* produttori di Vero-citotossina (VTEC) e *Campylobacter* nell'uomo. È un sistema coordinato fino al 2007 dalla Health Protection Agency (HPA), Londra, UK, e attualmente dall'ECDC, che si pone come obiettivo la sorveglianza di laboratorio e l'attivazione di sistemi di allerta rapidi per il controllo dei principali patogeni enterici, grazie alla partecipazione di vari Paesi europei ed alcuni extraeuropei.

È importante precisare, inoltre, che un'indagine accurata richiede, necessariamente, una valutazione integrata dei dati di genotipizzazione con quelli clinici ed epidemiologici, specialmente quando si valuta l'applicazione di nuove tecniche di genotipizzazione. Una tecnica di tipizzazione molecolare ideale

dovrebbe essere: applicabile a tutti gli isolati, capace di differenziare isolati non correlati epidemiologicamente (discriminante), riproducibile tra i diversi laboratori, rapida, economica e facile da eseguire; ma nessuna delle tecniche molecolari sopracitate singolarmente può essere considerata tale in quanto ciascuna di esse presenta punti di forza e debolezza che possono essere superati solo attraverso l'utilizzo combinato di differenti metodi molecolari.

Il potere discriminante è uno dei più importanti criteri di selezione di un metodo di genotipizzazione; in generale, l'MLVA e l'HRM sono più discriminanti rispetto alle tecniche che considerano markers che evolvono meno rapidamente (come nell'MLST), così come i metodi molecolari basati sull'analisi dell'intero genoma (come PFGE, AFLP, RFLP) che risultano più discriminanti rispetto a quelli che si limitano allo studio di un singolo locus, come la ribotipizzazione e la PCR-RFLP. È importante considerare che la capacità discriminante di un metodo è influenzata da altri fattori, come enzimi e primers utilizzati, condizioni enzimatiche e di amplificazione e caratteristiche epidemiologiche dei microrganismi testati.

Altri aspetti da valutare sono la riproducibilità del metodo nell'ambito dello stesso laboratorio e tra i laboratori e l'affidabilità dei risultati ottenuti dall'analisi dei profili molecolari che sono, generalmente, meno riproducibili e confrontabili rispetto a quelli basati sul sequenziamento.

Infine, nella scelta di un metodo è importante considerare anche il contesto epidemiologico in studio; la sorveglianza di "eventi epidemici locali" di infezioni batteriche, infatti, può essere effettuata solo utilizzando markers che evolvono rapidamente, come quelli studiati con l'MLVA, mentre per studi epidemiologici di popolazione o a lungo termine sono più appropriati i metodi basati sullo studio di markers stabili e conservati come MLST, PFGE e sequenziamento dell'intero genoma.

### ***Interpretazione dei risultati***

Nessun approccio molecolare attualmente disponibile e utilizzato singolarmente fornisce informazioni esaustive a causa dei tanti ostacoli operativi che, ancora oggi, devono essere affrontati come la non disponibilità di strumenti bioinformatici, utili per una corretta interpretazione dei dati, il confronto tra procedure e l'adozione di protocolli ottimizzati ed aggiornati. È, inoltre, evidente che la comprensione dei complessi meccanismi biologici che caratterizzano l'epidemiologia dei microrganismi patogeni, non può prescindere dalla raccolta, oltre che dei dati molecolari, anche delle informazioni di tipo epidemiologico e non può avvenire se non in associazione con l'applicazione dei metodi di tipizzazione tradizionali come l'analisi dei profili biochimici, del sierotipo, del fagotipo, del profilo di resistenza agli antimicrobici e della presenza di fattori di virulenza; è opportuno, infatti, evitare di fare una valutazione basandosi su un singolo parametro (6).

Un'attenta interpretazione dei risultati di tipizzazione molecolare non può prescindere dal considerare alcuni aspetti che possono influenzare, in maniera determinante, i risultati finali ed in particolare, le conoscenze relative al metodo di tipizzazione (inclusa la qualità dei dati), la diversità dei microrganismi ed il contesto epidemiologico. Per quanto riguarda il primo aspetto, è importante considerare che, anche quando vengono utilizzate procedure standardizzate di tipizzazione, si possono verificare degli artefatti che possono portare a conclusioni sbagliate (per questo è quanto mai importante conoscerne la natura, riconoscerli e correggerli). Nella PFGE, ad esempio, alcuni artefatti sono rappresentati dalle "ghost bands" (bande fantasma), determinate da una restrizione incompleta, e da piccole differenze nella risoluzione delle bande (ad esempio, una banda spessa piuttosto che due bande sottili); nei metodi basati sulla PCR, quali RAPD e rep-PCR, invece, un

enorme problema, spesso causa di confusione nell'interpretazione dei dati, è la differente intensità delle bande. I programmi bioinformatici, utilizzati per l'analisi dei profili molecolari, permettono, comunque, di definire una "tolleranza nella posizione delle bande" che viene calcolata valutando la riproducibilità del metodo (consiste nel far correre lo stesso isolato più volte in gel differenti, misurando la massima variazione di tutti i duplicati ottenuti).

Per quanto concerne la diversità dei microrganismi è importante considerare che una bassa diversità genetica indica un'alta probabilità che due isolati possano originare da una fonte comune, mentre una diversità sostanziale denota la possibilità che vi sia una sottopopolazione clonale nell'ambito di un microrganismo non clonale; quando un microrganismo mostra, invece, una variabilità estrema non può essere effettuato nessun confronto significativo (28).

Altro aspetto importante è il contesto epidemiologico; è noto, infatti, che isolati batterici, responsabili di eventi epidemici con sorgente "puntiforme" o "puntuale" ("point source"), mostrano poche differenze, in quanto i ceppi hanno poco tempo per subire cambiamenti genetici, mentre nel caso di eventi epidemici comunitari e nosocomiali, durante i quali il ceppo si trasmette da individuo ad individuo, ci si attende una variabilità maggiore (204).

#### *Interpretazione dei profili di frammenti di DNA*

La relazione genetica tra isolati è spesso determinata mediante l'applicazione di metodi di tipizzazione molecolare basati sul peso molecolare di frammenti visualizzati dopo separazione elettroforetica, in termini di numero di bande e di differenze o percentuale di similarità tra i profili di bande. Quest'ultima modalità è quella più attendibile in quanto la valutazione è indipendente dalla complessità dell'analisi di un profilo e richiede semplici calcoli matematici; tut-

tavia, può essere influenzata dal livello di tolleranza scelto nelle differenti posizioni delle bande per ogni analisi.

Il numero assoluto di bande differenti è una misura che deve essere interpretata con attenzione; il peso deve essere correlato al numero di frammenti di DNA separati, a loro volta correlati ai tassi di variazione genomica intra-specie, alla scelta e al numero di siti genomici testati (di per sé dipendenti dagli enzimi di restrizione e/o da primers/sonde utilizzati) e alle condizioni di amplificazione e/o di separazione (6).

#### *Interpretazione dei profili generati mediante PFGE*

Le relazioni genetiche tra isolati batterici in base ai pattern di PFGE sono stabilite in accordo con i criteri proposti da *Tenover et al.* (1995) (205), per i quali, nell'ambito di eventi epidemici di durata limitata, isolati che differiscono da 1 a 3 bande (un singolo evento genetico) sono considerati "strettamente correlati" e pertanto "probabilmente" appartenenti ad uno stesso evento epidemico; isolati che differiscono da 4 a 6 bande (due eventi genetici) sono "possibilmente correlati" e quindi "possibilmente" appartenenti ad un evento epidemico; isolati con 6 o più bande di differenza (3 o più cambiamenti genetici) sono considerati "non correlati" o differenti e quindi non appartenenti all'evento epidemico.

Tuttavia, di recente, i CDC (Centers for Disease Control and Prevention) hanno stabilito nuove raccomandazioni per l'interpretazione dei profili di PFGE poiché i criteri di *Tenover* non considerano adeguatamente alcune differenze come, per esempio, il trasferimento orizzontale dei geni e non sono applicabili a tutte le situazioni (206). I nuovi criteri proposti, inoltre, dipendono dalla storia naturale del microrganismo da tipizzare piuttosto che dalle differenze nelle bande e nella loro posizione come riportato da *Tenover et al.* (205).

Secondo le raccomandazioni proposte da *Barrett et al.* (2006) (206), nell'interpre-



tazione dei risultati di PFGE bisogna tener conto di tre aspetti fondamentali:

- la qualità del gel utilizzato per effettuare la corsa elettroforetica; un gel che include digestioni parziali, artefatti o in cui le bande non sono marcate e ben chiare, dovrebbe essere fatto ricorrere, senza provare ad interpretare i risultati ottenuti (se il gel utilizzato è di qualità elevata può essere più efficientemente interpretato);

- la diversità del microrganismo testato, non dimenticando che un lieve cambiamento del profilo in una popolazione molto omogenea è probabilmente più significativo rispetto a quello che si verifica in una popolazione eterogenea. I dati disponibili dal PulseNet forniscono sufficienti informazioni per condurre in maniera più precisa e attenta una valida interpretazione dei risultati;

- le informazioni temporali e geografiche relative all'evento epidemico; il tempo, infatti, è uno dei fattori critici nell'interpretazione dei risultati di tipizzazione e nelle epidemie di breve durata, il breve tempo impedisce, infatti, il verificarsi di mutazioni e pertanto di determinare un pattern diverso. Nel caso delle epidemie di origine alimentare, gli individui sono esposti allo stesso alimento contaminato nello stesso momento e pertanto la variabilità tra gli isolati è certamente minima, mentre nel caso di epidemie comunitarie o nosocomiali, caratterizzate da un periodo di tempo prolungato, i ceppi tendono a trasmettersi da individuo ad individuo determinando, una maggior probabilità di mutazioni e quindi un cambiamento del profilo molecolare di PFGE.

#### *Interpretazione dei profili generati mediante amplificazione con PCR*

L'assegnazione di un "tipo" mediante l'analisi dei profili generati con la PCR è ancora più complessa rispetto alla PFGE, poiché le differenze tra le bande non sono, molto spesso, abbastanza chiare ed è necessario considerare anche l'intensità delle bande generate. Per facilitare l'interpretazione dei

dati è utile considerare alcune raccomandazioni ed, in particolare, tener conto che gli isolati che differiscono per una o più bande dovrebbero essere assegnati a tipi distinti e che una diversa intensità della banda dovrebbe essere considerata solo quando è stata dimostrata inequivocabilmente mediante esperimenti ripetuti.

Per l'analisi computerizzata di profili genetici generati mediante PCR e AFLP, la misura più appropriata di similarità da utilizzare è il coefficiente di correlazione di Pearson, che è indipendente dall'intensità dei profili, è poco sensibile alle differenze di background e non risente dell'identificazione soggettiva delle bande e dei criteri di band-matching poiché confronta l'intero profilo rispetto alle caratteristiche delle bande e alla loro intensità. Per l'analisi dei profili generati mediante la PCR-RFLP è, invece, raccomandato l'utilizzo di un coefficiente basato su bande come il coefficiente di Dice (6).

#### *Interpretazione dei profili di MLVA*

Nell'ambito di potenziali eventi epidemici, l'analisi dei profili di MLVA, così come per altri metodi molecolari, è molto più completa se combinata con studi di popolazione ed indica la probabilità di un cambiamento, in un particolare locus, durante l'arco di tempo di una epidemia; isolati appartenenti ad una epidemia avranno o dovrebbero avere un identico profilo di MLVA.

Tale metodica può essere utilizzata anche per lo studio delle popolazioni microbiche; un approccio frequentemente utilizzato è lo sviluppo del Minimum Spanning Tree, che permette di generare una mappa di relazioni predittive tra ceppi sulla base di una variante ad un singolo locus (il profilo varia ad un solo locus) e dual-locus (il profilo varia a due loci). Qualora possa essere assunto che la variazione nel numero di ripetizioni in un particolare locus è "stepwise" ossia graduale (ad esempio un isolato con sei copie di una ripetizione a un dato locus è più correlato ad un isolato con cinque ripetizioni rispetto a un

altro che presenta quattro ripetizioni), possono essere applicati altri metodi, che tengono conto del numero di ripetizioni (6).

### *Interpretazione delle differenze nelle sequenze di DNA*

Le tecniche di sequenziamento genico sostituiscono quelle basate su bande, soprattutto per le difficoltà che emergono dal confronto dei profili di bande tra diversi laboratori; l'unico prerequisito del sequenziamento è rappresentato dall'accuratezza dei dati. L'importanza di ogni database di sequenze è determinata dalla qualità dei dati inseriti e, quindi, il ruolo del gestore del database è molto importante. I database principali (come MLST.net), allorchè viene individuato un nuovo tipo allelico, richiedono necessariamente la sottomissione di file di sequenza da laboratorio (181); il controllo dei dati, da parte del gestore del database, prima di accettare la sottomissione, garantisce che il nuovo tipo allelico non sia dovuto a un errore nella sequenza del DNA bensì ad una nuova sequenza. Se le sequenze di DNA sono inviate a un database in un formato testo, non è possibile garantire la qualità dei dati, se non il controllo di basi ambigue (la presenza di non-A, G, T, C, come N, R, W, Y), indicative di una sequenza originale non ottimale. Per ovviare a questi inconvenienti, sono stati sviluppati specifici programmi in grado di verificare la bontà del sequenziamento, quali ad esempio Phred e Phrap (207), anche se il controllo manuale rimane lo standard di riferimento (PulseNet e SalmGene sono tra quelli più rappresentativi). Il database *Legionella pneumophila* SBT, accessibile attraverso il website EWGLI, utilizza una combinazione di controlli di qualità di sequenza automatici e manuali (208).

## **Conclusioni**

Le metodiche molecolari, in questi ultimi anni, hanno subito un notevole cambiamento

ed una evoluzione tecnologica che facilita gli operatori nella conduzione delle indagini epidemiologiche e cliniche anche se, ancora oggi, l'applicazione di alcune tecniche non è ancora avvenuta nonostante i notevoli vantaggi che scaturiscono dal loro utilizzo. Sicuramente uno dei più grandi problemi connessi al non utilizzo di tali metodi è da ricercare nel costo elevato generalmente richiesto per l'acquisto delle attrezzature e dei reagenti, necessari per eseguire le indagini, ma anche alla complessità relativa all'analisi dei dati che molto spesso richiede conoscenze di bioinformatica che molti operatori non hanno. Tuttavia, anche se alcune delle tecnologie più recenti sono indisponibili in molti laboratori ve ne sono altre più economiche e già utilizzate di routine. La RAPD-PCR e la PFGE sono tecniche discriminanti per il monitoraggio di molti patogeni anche se devono, necessariamente, essere affiancate dalle comuni tecniche di biotipizzazione che risultano più economiche e utili a definire meglio le caratteristiche dei microrganismi in studio. In un'indagine epidemiologica, infatti, la combinazione di più tecniche permette di confermare o smentire dei dati, oppure di ottenere risposte su particolari aspetti non considerati. Questa tendenza è molto evidente nella letteratura scientifica, dove in molti studi viene riportato l'utilizzo di più metodiche fra loro complementari e tutto ciò in virtù del fatto che nessun test singolarmente risulta ottimale per tutti i microrganismi patogeni, che sono in continua evoluzione e cambiamento.

Le future innovazioni nella tecnologia molecolare sicuramente troveranno applicazione diretta nello studio dei microrganismi e permetteranno di affrontare in maniera più accurata e immediata le malattie infettive che emergeranno, non dimenticando, tuttavia, che è oltremodo necessario e indispensabile creare partenariati internazionali e interdisciplinari che certamente contribuiranno a migliorare la risposta alle eventuali minacce per la salute pubblica.

### Ringraziamenti

Si ringrazia la Dott.ssa Inconrona Fanelli, Cattedra di Igiene, Università degli Studi del Molise, per il prezioso contributo fornito alla revisione del manoscritto.

### Riassunto

La tipizzazione molecolare dei microrganismi patogeni rappresenta un importante strumento per la sorveglianza e lo studio dell'epidemiologia delle malattie infettive. Nonostante i notevoli vantaggi che scaturiscono dall'approccio molecolare, l'applicazione di routine, anche delle tecniche meno complesse, non è ancora avvenuta in maniera diffusa. Indubbiamente, l'indagine epidemiologica senza l'approccio molecolare è da ritenersi incompleta, essendo necessaria l'implementazione con i metodi tradizionali di tipizzazione ed epidemiologici. In base al meccanismo di funzionamento, le tecniche sono suddivise tra metodi basati sulla restrizione enzimatica, sull'amplificazione, sulla restrizione enzimatica seguita da amplificazione e sul sequenziamento. Nessuna tecnica di tipizzazione soddisfa, singolarmente, tutti i criteri di "performance" e "convenienza" e fornisce informazioni esaustive, pertanto, molto spesso, è opportuno utilizzare più metodi molecolari in parallelo. Inoltre, molti sono gli ostacoli operativi e le difficoltà da affrontare per la corretta interpretazione dei dati di genotipizzazione, che non può prescindere dal considerare alcuni aspetti che possono influenzare i risultati finali, in particolare le conoscenze relative al metodo di tipizzazione, inclusa la qualità dei dati, la diversità dei microrganismi ed il contesto epidemiologico. Per la Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE), considerata spesso come "gold standard", si applicano i criteri che tengono conto delle differenze nel numero e nella posizione delle bande, integrati più di recente con le raccomandazioni stabilite dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC), che considerano anche la qualità del gel, la storia naturale e la diversità del microrganismo, le informazioni temporali e geografiche dell'evento epidemico.

Le future innovazioni nelle tecnologie molecolari troveranno sempre maggiore applicazione diretta nello studio dei microrganismi e delle patologie infettive, insieme all'ampliamento dei partenariati internazionali e interdisciplinari, indispensabili per migliorare la risposta alle minacce per la salute pubblica.

### Bibliografia

- van Walle I. ECDC starts pilot phase for collection of molecular typing data. *Euro Surveill* 2013; **18**(3).
- Andrei A, Zervos MJ. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med* 2006; **130**(5): 662-8.
- Stefani S, Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2000; **13**(3): 143-53.
- Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 1990; **28**(9): 1903-5.
- Foxman B, Zhang L, Koopman JS, et al. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiol Perspect Innov* 2005; **25**: 2-10.
- van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**(3): 1-46.
- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; **303**(6-7): 298-304.
- Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis*. 2001; **33**(3): 108-15.
- Foley SL, Lynne AM, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* 2009; **9**(4): 430-40.
- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; **145**(3): 1365-73.
- Bricker BJ. Past, present and future of molecular technology applications for the epidemiology of bacterial diseases. *J Anal Bioanal Techniques* 2012; **3**(S): 1. doi: 10.4172/2155-9872.S10-001.
- Chu C, Wong DW, Wang MH, et al. Genotyping, Plasmid Analysis, and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans and Chickens in Central Taiwan. *J Formos Med Assoc* 2009; **108**(10): 765-71.
- Lee TM, Chang LL, Chang CY, et al. Molecular analysis of *Shigella sonnei* isolated from three well-documented outbreaks in school children. *J Med Microbiol* 2000; **49**(4): 355-60.
- Molina-Aja A, García-Gasca A, Abreu-Grobois A, et al. Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured

- penaeid shrimp. FEMS Microbiol Lett 2002; **213**(1): 7-12.
15. Sammarco ML, Ripabelli G, Fanelli I, et al. Prevalence and biomolecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from retail meat. J Food Prot 2010; **73**(4): 720-8.
  16. Velasco C, Romero L, Martínez JM, et al. Analysis of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) from *Escherichia coli* isolated from non-hospitalised patients in Seville. Int J Antimicrob Agents 2007; **29**(1): 89-92.
  17. Cheng J, Wang Q, Chen Y, et al. Phenotypic and molecular characterization of a novel beta-lactamase carried by *Klebsiella pneumoniae*, CTX-M-72, derived from CTX-M-3. J Gen Appl Microbiol 2009; **55**(3): 207-16.
  18. Fernández-Baca V, Ballesteros F, Hervás JA, et al. Molecular epidemiological typing of *Enterobacter cloacae* isolates from a neonatal intensive care unit: three-year prospective study. J Hosp Infect 2001; **49**(3): 173-82.
  19. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 1988; **1**(2): 228-43.
  20. Hoszowski A, Wasyl D. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka isolates. Vet Microbiol 2001; **80**(2): 139-48.
  21. Liebana E, Guns D, Garcia-Migura L, et al. Molecular typing of *Salmonella* serotypes prevalent in animals in England: assessment of methodology. J Clin Microbiol 2001; **39**(10): 3609-16.
  22. Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; **19**(3): 512-30.
  23. Hammer SM, Buchman TG, D'Angelo LJ, et al. Temporal cluster of herpes simplex encephalitis: investigation by restriction endonuclease cleavage of viral DNA. J Infect Dis 1980; **141**(4): 436-40.
  24. Kaper JB, Nataro JP, Roberts NC, et al. Molecular epidemiology of non-O1 *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* in the U.S. Gulf Coast region. J Clin Microbiol 1986; **23**(3): 652-4.
  25. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol 1987; **25**(4): 675-9.
  26. Tungpradabkul S, Panyim S, Wilairat P, Yuthavong Y. Analysis of DNA from various species and strains of malaria parasites by restriction endonuclease fingerprinting. Comp Biochem Physiol B 1983; **74**(3): 481-5.
  27. Todd R, Donoff RB, Kim Y, Wong DT. From the chromosome to DNA: restriction fragment length polymorphism analysis and its clinical application. J Oral Maxil Surg 2001; **59**(6): 660-7.
  28. Li W, Raoult D, Fournier PE. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev 2009; **33**(5): 892-916.
  29. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; **98**(3): 503-17.
  30. Grimont F, Verger JM, Cornelis P, et al. Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. Res Microbiol 1992; **143**(1): 55-65.
  31. Loutit JS, Tompkins LS. Restriction enzyme and Southern hybridization analyses of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1991; **29**(12): 2897-900.
  32. Tram C, Simonet M, Nicolas MH, et al. Molecular typing of nosocomial isolates of *Legionella pneumophila* serogroup 3. J Clin Microbiol 1990; **28**(2): 242-45.
  33. Foley SL, Zhao S, Walker RD. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. Foodborne Pathog Dis 2007; **4**(3): 253-76.
  34. Ueda F, Anahara R, Yamada F, et al. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. Int J Food Microbiol 2005; **105**(3): 455-62.
  35. Vargas AC, Costa MM, Vainstein MH, et al. Phenotypic and molecular characterization of bovine *Campylobacter fetus* strains isolated in Brazil. Vet Microbiol 2003; **93**(2): 121-32.
  36. Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. Clin Microbiol Rev 2008; **21**(2): 262-73.
  37. Zhou HJ, Diao BW, Cui ZG, et al. Comparison of automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for subtyping of *Vibrio cholerae*. Lett Appl Microbiol 2009; **48**(6): 726-31.
  38. Inuma Y. Identification and epidemiologic investigation of bacteria by the Riboprinter Microbial Characterization System, the automated ribotyping system. Rinsho Byori 2001; **49**(11): 1129-32.
  39. Eberle KN, Kiess AS. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and

- Campylobacter coli* in poultry. *Poult Sci* 2012; **91**(1): 255-64.
40. He DM, Zhu HM, Lai WD, et al. Automated ribotyping of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in food poisoning of Guangdong province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2011; **3**(9): 918-23.
  41. Jadhav S, Bhavne M, Palombo EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Methods* 2012; **88**(3): 327-41.
  42. Nielsen EM, Fussing V, Engberg J, et al. Most *Campylobacter* subtypes from sporadic infections can be found in retail poultry products and food animals. *Epidemiol Infect* 2006; **134**(4): 758-67.
  43. Oscar TP. Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. *J Food Prot* 1998; **61**(5): 519-24.
  44. Strand L, Jenkins A, Grude N, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant clonal group A: clonal analysis of Norwegian and Russian *E. coli* isolates. *APMIS* 2010; **118**(8): 571-7.
  45. Ben Abdeljelil J, Saghrouni F, Khammari I, et al. Investigation of a cluster of *Candida albicans* invasive Candidiasis in a neonatal intensive care unit by pulsed-field gel electrophoresis. *Scientific World Journal* 2012; 138989. doi: 10.1100/2012/138989.
  46. Garza-González E, Morfin-Otero R, Martínez-Vázquez MA, et al. Microbiological and molecular characterization of human clinical isolates of *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus sciuri*. *Scand J Infect Dis* 2011; **43**(11-12): 930-6.
  47. Laksanalamai P, Joseph LA, Silk BJ, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in a multistate listeriosis outbreak associated with cantaloupe in US. *PLoS One*. 2012; **7**(7):e42448. doi: 10.1371/journal.pone.0042448.
  48. Novoslavskij A, Sernienė L, Malakauskas A, et al. Prevalence and genetic diversity of enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs at farms and slaughter in Lithuania. *Res Vet Sci* 2013; **94**(2): 209-13.
  49. Orsini M, Amore R, Pietrangeli BM, et al. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Legionella pneumophila* typing. *Ital J Public Health* 2008; **5**(2): 143-8.
  50. Perko-Mäkelä P, Alter T, Isohanni P, et al. Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and *flaA*-short variable region sequencing. *Zoonoses Public Health* 2011; **58**(6): 388-98.
  51. Staley C, Harwood VJ. The use of genetic typing methods to discriminate among strains of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus*. *J AOAC Int* 2010; **93**(5): 1553-69.
  52. Thierfelder C, Keller PM, Kocher C, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Swiss Med Wkly* 2012; 142: w13540. doi: 10.4414/smw.2012.13540.
  53. Uysal A, Durak Y. Pulsed-field gel electrophoresis typing, antibiotic resistance, and plasmid profiles of *Escherichia coli* strains isolated from foods. *Can J Microbiol* 2012; **58**(11): 1278-87.
  54. Zhang XA, Bai XM, Ye CY, et al. Establishment and Comparison of Pulsed-field Gel Electrophoresis, Multiple-locus Variable Number Tandem Repeat Analysis and Automated Ribotyping Methods for Subtyping of *Citrobacter* Strains. *Biomed Environ Sci* 2012; **25**(6): 653-62.
  55. Zou M, Keelara S, Thakur S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 2012; **9**(3): 232-8.
  56. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Prot* 2007; **2**(3): 677-84.
  57. Dewaele I, Rasschaert G, Bertrand S, et al. Molecular characterization of *Salmonella Enteritidis*: comparison of an Optimized Multi-Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathog Dis* 2012; **9**(10): 885-95.
  58. Lukinmaa S, Nakari UM, Eklund M, Siitonen A. Application of molecular genetic methods in diagnostics and epidemiology of food-borne bacterial pathogens. *APMIS* 2004; **112**(11-12): 908-29.
  59. Melero B, Juntunen P, Hänninen ML, et al. Tracing *Campylobacter jejuni* strains along the poultry meat production chain from farm to retail by pulsed-field gel electrophoresis, and the antimicrobial resistance of isolates. *Food Microbiol* 2012; **32**(1): 124-8.
  60. Sihvonen LM, Toivonen S, Haukka K, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility patterns in discrimi-

- nation of sporadic and outbreak-related strains of *Yersinia enterocolitica*. BMC Microbiol 2011; **25**: 11-42.
61. Wiedmann M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. J AOAC Int 2002; **85**(2): 524-31.
  62. Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, et al. PulseNet USA: a five-year update. Foodborne Pathog Dis 2006; **3**(1): 9-19.
  63. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV; CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. Emerg Infect Dis 2001; **7**(3): 382-9.
  64. Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. Foodborne Pathog Dis 2006; **3**(1): 36-50.
  65. Cooper KL, Luey CK, Bird M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae*. Foodborne Pathog Dis 2006; **3**(1): 51-8.
  66. Halpin JL, Garrett NM, Ribot EM, et al. Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. Foodborne Pathog Dis 2010; **7**(3): 293-8.
  67. Kam KM, Luey CK, Parsons MB, et al. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: an international multicenter collaborative study. J Clin Microbiol 2008; **46**(8): 2766-73.
  68. Pichel M, Brengi SP, Cooper KL, et al. *Shigella flexneri* PulseNet PFGE Protocol Working Group. Standardization and international multicenter validation of a PulseNet pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Shigella flexneri* isolates. Foodborne Pathog Dis 2012; **9**(5): 418-24.
  69. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathog Dis 2006; **3**(1): 59-67.
  70. Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. Clin Chim Acta 2006; **363**(1-2): 206-20.
  71. Whitcombe D, Brownie J, Gillard HL, et al. A homogeneous fluorescence assay for PCR amplicons: its application to real-time, single-tube genotyping. Clin Chem 1998; **44**(5): 918-23.
  72. Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. Methods 2001; **25**(4): 430-42.
  73. Anklam KS, Kanankege KS, Gonzales TK, et al. Rapid and reliable detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time multiplex PCR. J Food Prot 2012; **75**(4): 643-50.
  74. Colavita G, Rotili M, Leone A, et al. Identification of emesis-causing *Bacillus cereus* strains by polymerase chain reaction: preliminary results. Vet Res Commun 2007; **31**(1): 351-3.
  75. Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM, et al. Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. Int J Food Microbiol 1999; **49**(1-2): 43-8.
  76. Temelli S, Kahya S, Eyigor A, Carli KT. Incidence of *Salmonella enteritidis* in chicken layer flocks in Turkey: results by real-time polymerase chain reaction and International Organization for Standardization culture methods. Poult Sci 2010; **89**: 1406-10.
  77. Vitullo M, Grant KA, Sammarco ML, et al. Real-time PCRs assay for serogrouping *Listeria monocytogenes* and differentiation from other *Listeria* spp. Mol Cell Probes 2013; **27**(1): 68-70.
  78. Power EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. J Hosp Infect 1996; **34**(4): 247-65.
  79. Ripabelli G, Sammarco ML, McLauchlin J, Fanelli I. Molecular characterisation and antimicrobial resistance of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio alginolyticus* isolated from mussels (*Mytilus galloprovincialis*). Syst Appl Microbiol 2003; **26**(1): 119-26.
  80. Meunier JR, Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res Microbiol 1993; **144**(5): 373-9.
  81. Ashayeri-Panah M, Eftekhari F, Feizabadi MM. Development of an optimized random amplified polymorphic DNA protocol for fingerprinting of *Klebsiella pneumoniae*. Lett Appl Microbiol 2012; **54**(4): 272-9.

82. Ben Haj Khalifa A, Vu-Thien H, Pourcel C, et al. Phenotypic and genotypic (randomly amplified polymorphic DNA analysis and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) characterization of 96 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the F. Bourguiba hospital (Monastir, Tunisia). *Pathol Biol (Paris)* 2010; **58**(1): 84-8.
83. Kołakowska A, Madajczak G. Genotyping methods of *Listeria monocytogenes*. *Przegl Epidemiol* 2011; **65**(3): 421-7.
84. Kumar D, Chaudhary K, Boora KS. Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains by PCR-RAPD based fingerprinting. *Indian J Microbiol* 2010; **50**(1): 27-32.
85. Kuwana R, Imamura D, Takamatsu H, Watabe K. Discrimination of the *Bacillus cereus* group members by pattern analysis of random amplified polymorphic DNA-PCR. *Biocontrol Sci* 2012; **17**(2): 83-6.
86. Lee J, Kwon GH, Park JY, et al. A RAPD-PCR method for the rapid detection of *Bacillus cereus*. *J Microbiol Biotechnol* 2011; **21**(3): 274-6.
87. Morandi S, Brasca M, Lodi R, et al. Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Res Vet Sci* 2010; **88**(3): 427-35.
88. Sadok K, Mejdji S, Nourhen S, Amina B. Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks. *Folia Microbiol (Praha)* 2013; **58**(1): 17-26.
89. Shuan Ju Teh C, Thong KL, Osawa R, Heng Chua K. Comparative PCR-based fingerprinting of *Vibrio cholerae* isolated in Malaysia. *J Gen Appl Microbiol* 2011; **57**(1): 19-26.
90. Smith SI, Fowora MA, Goodluck HA, et al. Molecular typing of *Salmonella* spp isolated from food handlers and animals in Nigeria. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2011; **2**(1): 73-7.
91. Ye Y, Jiang Q, Wu Q, et al. The characterization and comparison of *Staphylococcus aureus* by antibiotic susceptibility testing, enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction, and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Dis* 2012; **9**(2): 168-71.
92. Lupski JR, Weinstock GM. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *J Bacteriol* 1992; **174**(14): 4525-9.
93. Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods Cell Mol Biol* 1994; **5**: 25-40.
94. Hiatt KL, Seal BS. Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Methods Mol Biol* 2009; **551**: 49-58.
95. Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**(4): 6823-31.
96. Stern MJ, Ames GF, Smith NH, et al. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 1984; **37**(3): 1015-26.
97. Cao Y, Wei D, Kamara IL, Chen W. Multi-Locus Sequence Typing (MLST) and Repetitive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction (REP-PCR), characterization of *Shigella* spp. over two decades in Tianjin China. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2012; **3**(4): 321-32.
98. Doléans-Jordheim A, Cournoyer B, Bergeron E, et al. Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semiautomated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; **28**(9): 1105-11.
99. Kilic A, Bedir O, Kocak N, et al. Analysis of an outbreak of *Salmonella enteritidis* by repetitive sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Intern Med* 2010; **49**(1): 31-6.
100. Pasanen T, Kotila SM, Horsma, et al. Comparison of repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR with PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis in studying the clonality of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**(2): 166-75.
101. Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 5642-7.
102. Te Witt R, Kanhai V, van Leeuwen WB. Comparison of the DiversiLab system, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multi-Locus Sequence Typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J Microbiol Methods* 2009; **77**(1): 130-3.
103. Tenover FC, Gay EA, Frye S, et al. Compari-

- son of typing results obtained for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2009; **47**(8): 2452-7.
104. Wilson MK, Lane AB, Law BF, et al. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. *Microb Ecol* 2009; **58**(4): 843-55.
105. Larsson JT, Torpdahl M, Petersen RF, et al. Development of a new nomenclature for *Salmonella typhimurium* multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). *Euro Surveill* 2009; **14**(15):pii:19174.
106. Ugorski M, Chmielewski R. REP and ERIC repetitive DNA sequences in bacteria-diagnostic significance. *Postepy Hig Med Dosw* 2000; **54**(1): 3-15.
107. Chen W, Xie Y, Xu J, et al. Molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from the middle-east coastline of China. *Int J Food Microbiol* 2012; **153**(3): 402-12.
108. Dorneles EM, Santana JA, Andrade GI, et al. Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from goats using ERIC-PCR. *Genet Mol Res* 2012; **11**(3): 2051-9.
109. Katara J, Deshmukh R, K Singh N, Kaur S. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *J Gen Appl Microbiol* 2012; **58**(2): 83-94.
110. Kosek M, Yori PP, Gilman RH, et al. Facilitated molecular typing of *Shigella* isolates using ERIC-PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2012; **86**(6): 1018-25.
111. Leone A, Rotili M, Fanelli I, et al. Epidemiologia molecolare di *Campylobacter* spp.: confronto tra PFGE ed ERIC-PCR. VI Workshop Nazionale Enter-net Italia Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, Le tossinfezioni alimentari: sorveglianza e controllo. Roma: ISS, 2007 (ISTISAN Congressi 07/C1).
112. Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res* 1995; **5**(4): 408-18.
113. Martin B, Humbert O, Camara M, Guenzi E, et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**(13): 3479-83.
114. Singh V, Chaudhary DK, Mani I, et al. Genotyping of *Aeromonas hydrophila* by box elements. *Mikrobiologiia* 2010; **79**(3): 390-3.
115. Johnson JR, Clabots C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; **7**(2): 258-64.
116. Healy M, Huong J, Bittner T, et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(1): 199-207.
117. Eckert C, Van Broeck J, Spigaglia P, et al. Comparison of a commercially available repetitive-element PCR system (DiversiLab) with PCR ribotyping for typing of *Clostridium difficile* strains. *J Clin Microbiol* 2011; **49**(9): 3352-4.
118. Kardén-Lilja M, Vuopio J, Koskela M, et al. Molecular typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system compared with pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *Scand J Infect Dis* 2013; **45**(5): 350-6.
119. Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol* 2008; **85**(1): 50-8.
120. Lévesque S, Michaud S, Arbeit RD, Frost EH. High-resolution melting system to perform multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One* 2011; **6**(1):e16167. doi: 10.1371/journal.pone.0016167
121. Millat G, Chanavat V, Julia S, et al. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the LMNA gene. *Clin Biochem* 2009; **42**(9): 892-8.
122. Taylor CF. Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochem Soc Trans* 2009; **37**(2): 433-7.
123. Merchant-Patel S, Blackall PJ, Templeton J, et al. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* genotyping by high-resolution melting analysis of a *flaA* fragment. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**(2): 493-9.
124. Antolinós V, Fernández PS, Ros-Chumillas M, et al. Development of a high-resolution



- melting-based approach for efficient differentiation among *Bacillus cereus* group isolates. *Foodborne Pathog Dis* 2012; **9**(9): 777-85.
125. Tamburro M, Grant K, Amar C, et al. High Resolution Melting Analysis (HRMA) per la caratterizzazione molecolare di LIPI-1 e inLAB in *Listeria monocytogenes*. VII Workshop Nazionale Enter-net Italia Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, Infezioni trasmesse da alimenti e acqua: diagnostica ed epidemiologia. Roma: ISS, 2009 (ISTISAN Congressi 09/ C10).
  126. Yadav R, Sethi S, Mewara A, et al. Rapid detection of rifampicin, isoniazid and streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates by high-resolution melting curve analysis. *J Appl Microbiol* 2012; **113**(4): 856-62.
  127. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 2009; **15**(2): 62-9.
  128. Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**(21): 4407-14.
  129. Blears MJ, De Grandis SA, Lee H, Trevros JT. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *J Indust Microbiol & Biotechnology* 1998; **21**: 99-114.
  130. Ripabelli G, McLauchlin J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis for DNA fingerprinting. In: Jürgen F, Maurizio Podda, Eds. *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*. New York, USA: Marcel Dekker, 2004: 68-72.
  131. Fry NK, Afshar B, Visca P, et al. Assessment of fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis for epidemiological genotyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Clin Microbiol Infect* 2005; **11**(9): 704-12.
  132. Boghenbor KK, On SL, Kokotovic B, et al. Genotyping of human and porcine *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia intermedia*, and *Yersinia bercovieri* strains from Switzerland by amplified fragment length polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**(6): 4061-6.
  133. Duim B, Vandamme PA, Rigter A, et al. Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology* 2001; **147**(10): 2729-37.
  134. Fearnley C, On SL, Kokotovic B, et al. Application of fluorescent amplified fragment length polymorphism for comparison of human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Appl Environ Microbiol* 2005; **71**(9): 4960-5.
  135. Iyoda S, Wada A, Weller J, et al. Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *Microbiol Immunol* 1999; **43**(8): 803-6.
  136. McLauchlin J, Ripabelli G, Brett MM, Threlfall EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *Int J Food Microbiol* 2000; **56**(1): 21-8.
  137. Ripabelli G, McLauchlin J, Threlfall EJ. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Syst Appl Microbiol* 2000; **23**(1): 132-6.
  138. Ripabelli G, McLauchlin J, Mithani V, Threlfall EJ. Epidemiological typing of *Bacillus cereus* by amplified fragment length polymorphism. *Lett Appl Microbiol* 2000; **30**(5): 358-63.
  139. Sammarco ML, Ripabelli G, Dionisi AM, et al. Molecular typing by amplified fragment length polymorphism and PCR-restriction fragment length polymorphism, biotyping and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni*. *Ann Ig* 2003; **15**(1): 11-21.
  140. Sammarco ML, Vitullo M, Tamburro M, et al. Amplified fragment length polymorphism analysis of *Listeria monocytogenes* by Experion™ automated microfluidic electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2011; **87**(1): 119-24.
  141. Sirisriro T, Sethabutr O, Mason C, et al. An AFLP-based database of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolates and its use for the identification of untypable *Shigella* strains. *J Microbiol Methods* 2006; **67**(3): 487-95.
  142. Tamada Y, Nakaoka Y, Nishimori K, et al. Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(3): 1057-66.
  143. Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. *J Microbiol Methods* 2011; **84**(2): 194-201.
  144. Beutin L, Miko A, Krause G, et al. Identifica-

- tion of human-pathogenic strains of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food by a combination of serotyping and molecular typing of Shiga toxin genes. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**(15): 4769-75.
145. Dawson CE, Stubberfield EJ, Perrett LL, et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Brucella* isolates from marine mammals. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 224.
  146. Dilmaghani M, Ahmadi M, Zahraei Salehi T, et al. PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of *fljB* gene in *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Typhimurium* isolated from avians. *Iran J Microbiol* 2010; **2**(4): 178-84.
  147. Leone A, Ripabelli G, Sammarco ML, Grasso GM. Detection of *Cryptosporidium* spp. from human faeces by PCR-RFLP, cloning and sequencing. *Parasitol Res* 2009; **104**(3): 583-7.
  148. Tamburro M, Ripabelli G, Fanelli I, et al. Typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated in Italy by *inlA* gene characterization and evaluation of a new cost-effective approach to antisera selection for serotyping. *J Appl Microbiol* 2010; **108**(5): 1602-11.
  149. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *P Natl Acad Sci USA* 1977; **74**: 5463-7.
  150. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 2001; **11**(1): 3-11.
  151. Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16s rDNA fragments. 2002. *APMIS* 2007; **115**(5): 668-77.
  152. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* 2007; **24**: 133-41.
  153. Ansoorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 2009; **25**(4): 195-203.
  154. Steer AC, Law I, Matatolu L, et al. Global emm type distribution of group A *streptococci*: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* 2009; **9**(10): 611-6.
  155. Bessen DE, McGregor KF, Whatmore AM. Relationships between *emm* and multilocus sequence types within a global collection of *Streptococcus pyogenes*. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 59.
  156. Carrico JA, Silva-Costa C, Melo-Cristino J, et al. Illustration of a common framework for relating multiple typing methods by application to macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(7): 2524-32.
  157. Frenay HM, Bunschoten AE, Schouls LM, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; **15**(1): 60-4.
  158. Hallin M, Deplano A, Denis O, et al. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and *spa* typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(1): 127-33.
  159. Meinersmann RJ, Hessel LO, Fields PI, Hiatt KL. Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolates by *fla* gene sequencing. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(11): 2810-4.
  160. Mellmann A, Mosters J, Bartelt E, et al. Sequence-based typing of *flaB* is a more stable screening tool than typing of *flaA* for monitoring of *Campylobacter* populations. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(10): 4840-2.
  161. Price EP, Thiruvankataswamy V, Mickan L, et al. Genotyping of *Campylobacter jejuni* using seven single nucleotide polymorphisms in combination with *flaA* short variable region sequencing. *J Med Microbiol* 2006; **55**(8): 1061-70.
  162. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**(6): 3140-5.
  163. Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, et al. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(1): 14-23.
  164. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998; **144**(11): 3049-60.
  165. Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; **38**(3): 1008-15.
  166. Enright MC, Spratt BG, Kalia A, et al. Multilocus sequence typing of *Streptococcus pyogenes* and the relationships between *emm* type and clone. *Infec Immun* 2001; **69**(4): 2416-27.
  167. Godoy D, Randle G, Simpson AJ, et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relation-

- ships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J Clin Microbiol 2003; **41**(5): 2068-79.
168. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2002; **40**(6): 1963-71.
  169. Jones N, Bohnsack JF, Takahashi S, et al. Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. J Clin Microbiol 2003; **41**(6): 2530-6.
  170. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. J Clin Microbiol 2002; **40**(10): 3671-80.
  171. Meats E, Feil EJ, Stringer S, et al. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2003; **41**(4): 1623-36.
  172. Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, et al. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. J Clin Microbiol 2003; **41**(2): 757-62.
  173. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol 2003; **11**(10): 479-87.
  174. Didelot X, Maiden MCJ. Impact of recombination on bacterial evolution. Trends Microbiol 2010; **18**(7): 315-22.
  175. van Leeuwen WB. Molecular diagnostics in clinical microbiology. Iran J Microbiol 2009; **1**(2): 5-20.
  176. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol 2006; **60**: 561-88.
  177. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect Genet Evol 2013; **16**: 38-53.
  178. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, et al. Ribosomal Multi-Locus Sequence Typing: universal characterisation of bacteria from domain to strain. Microbiology 2012; **158**(4): 1005-15.
  179. Jolley KA, Maiden MCJ. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics 2010; **11**: 595.
  180. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Res 2005; **33**(Web Server issue): W728-W733.
  181. Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstdb-Net-distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics 2004; **5**: 86.
  182. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 2004; **186**(5): 1518-30.
  183. Gaia V, Fry NK, Harrison TG, Peduzzi R. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. J Clin Microbiol 2003; **41**(7): 2932-9.
  184. Harbottle H, White D, McDermott P, et al. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. J Clin Microbiol 2006; **44**(7): 2449-57.
  185. Parkhill J, Sebahia M, Preston A, et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. Nat Genet 2003; **35**(1): 32-40.
  186. Torpdahl M, Skov M, Sandvang D, Baggesen DL. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. J Microbiol Methods 2005; **63**(2): 173-84.
  187. Murphy M, Corcoran D, Buckley J, et al. Development and application of multiple-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) to subtype a collection of *Listeria monocytogenes*. Int J Food Microbiol 2007; **115**(2): 187-94.
  188. Sabat A, Krzyszton-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J Clin Microbiol 2003; **41**(4): 1801-4.
  189. van Belkum A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). FEMS Immunol Med Microbiol 2007; **49**(1): 22-7.
  190. Denoeud F, Vergnaud G. Identification of polymorphic tandem repeats by direct comparison of genome sequence from different bacterial

- strains: a web-based resource. *BMC Bioinformatics* 2004; **5**: 4.
191. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 2005; **26**(13): 2567-82.
192. 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**(10): 2928-36.
193. Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999; **27**(2): 573-80.
194. Lindstedt BA, Vardund T, Aas L, Kapperud G. Multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* using PCR multiplexing and multicolor capillary electrophoresis. *J Microbiol Methods* 2004; **59**(2): 163-72.
195. Cebula TA, Jackson SA, Brown EW, et al. Chips and SNPs, bugs and thugs: a molecular sleuthing perspective. *J Food Prot* 2005; **68**(6): 1271-84.
196. Levy DD, Sharma B, Cebula TA. Single-Nucleotide Polymorphism Mutation Spectra and Resistance to Quinolones in *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* with a Mutator Phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**(7): 2355-63.
197. Leone A, Ripabelli G, Fanelli I, et al. Valutazione della prevalenza di SNPs mediante Real-Time PCR per l'individuazione dei complessi clonali di appartenenza di *Campylobacter jejuni* isolati da alimenti ed animali. VI Workshop Nazionale Enter-net Italia Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, Le tossinfezioni alimentari: sorveglianza e controllo. Roma: ISS, 2007 (ISTISAN Congressi 07/C1).
198. Clevon BE, Palka-Santini M, Gielen J, et al. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(7): 2389-97.
199. Szmolka A, Anjum MF, La Ragione RM, et al. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet Microbiol* 2012; **156**(1-2): 110-8.
200. Marotta F, Zilli K, Tonelli A, et al. Detection and genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by use of DNA oligonucleotide arrays. *Mol Biotechnol* 2013; **53**(2): 182-8.
201. Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, et al. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. *Int J Hyg Environ Health* 2009; **212**(3): 330-7.
202. Agodi A, Barchitta M, Valenti G, et al. Cross-transmission of *Klebsiella pneumoniae* in two intensive care units: intra- and inter-hospital spread. *J Hosp Infect* 2011; **77**(3): 279-80.
203. Zarrilli R, Di Popolo A, Bagattini M, et al. Clonal spread and patient risk factors for acquisition of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit in Italy. *J Hosp Infect* 2012; **82**(4): 260-5.
204. Gerner-Smidt P, Hyytiä-Trees E, Rota PA. Molecular epidemiology. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry MLL, Warnock DW, Eds. *Manual of clinical microbiology*. 10th edition Vol 1. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2011: 100-23.
205. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; **33**(9): 2233-9.
206. Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog Dis* 2006; **3**(1): 20-31.
207. Machado M, Magalhães WC, Sene A, et al. Phred-Phrap package to analyses tools: a pipeline to facilitate population genetics resequencing studies. *Investig Genet* 2011; **2**(1): 3. doi: 10.1186/2041-2223-2-3.
208. Gaia V, Fry NK, Afshar B, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(5): 2047-52.