

# 1. Introduzione

Il presente elaborato nasce nel tentativo di mostrare l'applicazione della Microbiologia in ambito giuridico, seguendo l'iter tecnico-scientifico impiegato da un Biologo a seguito di incarico di consulenza tecnica d'ufficio (CTU) di natura biologico-forense.

## 1.1. Cos'è la Microbiologia

Nata come scienza circa un secolo e mezzo fa, la Microbiologia, cioè la biologia dei microrganismi, ha conosciuto negli ultimi sessant'anni una spettacolare evoluzione che ha contribuito in modo determinante a sviluppare l'attuale visione globale del mondo vivente e la comprensione, specialmente a livello molecolare, di processi biologici fondamentali (Dehò & Galli, 2019).

Tutti gli organismi viventi sono costituiti da cellule, unità strutturali elementari cui possiamo attribuire le proprietà essenziali del vivente. La maggior parte degli organismi viventi presenti sulla Terra sono costituiti da una sola cellula (organismi unicellulari), i restanti presentano più cellule (organismi pluricellulari). L'insieme di tutti gli organismi unicellulari, di alcune classi di organismi pluricellulari e dei virus che sono acellulari rappresenta i cosiddetti microrganismi o microbi, terminologia derivante dal fatto che normalmente questi organismi non sono visibili a occhio nudo; per osservarne quindi la loro morfologia è necessario ricorrere al microscopio ottico (Dehò & Galli, 2019). In questa classificazione sono inclusi batteri, archea, virus, funghi, prioni, protozoi e alghe, le cui strutture e funzioni sono ambito di studio della Microbiologia.

La Microbiologia ha via via assunto un ruolo sempre più rilevante tra le discipline biologiche, sia come disciplina specialistica, sia per la visione globale e unificante che riesce a fornire del mondo vivente (Dehò & Galli, 2019). Con l'avanzamento delle conoscenze in questo settore, sono infatti nate delle nuove branche della Microbiologia che si occupano di studiare specificamente alcuni tipi di microrganismi, tra cui virologia, batteriologia, micologia, parassitologia e protozoologia (Stang & Anderson, 2013).

È una scienza relativamente giovane in quanto solo a partire dalla seconda metà del XIX secolo è stato possibile studiare i microrganismi in laboratorio. Tuttavia la storia della Microbiologia risale all'antichità: l'uomo, fin dalla Preistoria, aveva avuto la possibilità di osservare e nutrirsi di strutture macroscopiche prodotte da microrganismi, quali i corpi fruttiferi di alcuni funghi (Dehò & Galli, 2019).

Dalla metà dell'Ottocento, ma soprattutto nei primi del Novecento, fino allo scoppio della Prima Guerra Mondiale, la Microbiologia ha assunto un ruolo importante nella comprensione delle basi della vita: il lavoro di illustri microbiologi, quali Pasteur, Koch, Beijerinck e Vinogradskij, ha delineato la cosiddetta "Età d'oro della Microbiologia", epoca durante la quale questa disciplina si è saldamente affermata come scienza e sono state messe le basi per il suo sviluppo in due direzioni: come scienza di base e come scienza applicata. Da quel momento i microrganismi sono stati, e sono ancor oggi, il principale modello di studio per la comprensione a livello molecolare dei processi biologici. Molti sono stati infatti gli esperimenti condotti su microrganismi che hanno posto le basi delle più importanti discipline biologiche, quali in particolare la biochimica, la genetica e la biologia molecolare (Chandler, 2008; Dehò & Galli, 2019).

## **1.2. Perché la Microbiologia è importante e quali sono le sue diverse applicazioni**

*Signori, spetterà ai microbi l'ultima parola. [...]  
In natura, il ruolo dell'infinitamente piccolo è infinitamente grande*

(Louis Pasteur)

Lo studio dei microrganismi ci permette di comprendere come funzionano gli ecosistemi e qual è il nostro ruolo al loro interno. Oggi, la vita sulla Terra dipende interamente dal mondo microbico: i microrganismi sono coinvolti nel mantenimento della biodiversità e di un ambiente compatibile con la vita. Si stima che il 50% della biomassa del nostro Pianeta sia microbica e la quantità dei soli loro virus è stata stimata con un numero astronomico che si avvicina a  $10^{31}$  (Chandler, 2008). I microbi svolgono funzioni chiave nel ciclo dei nutrienti, nella biodegradazione e nel biodeterioramento, nei cambiamenti climatici, nel deperimento degli alimenti, nella determinazione e nel controllo dell'evolversi delle malattie e nelle biotecnologie moderne. Grazie alla loro versatilità, inoltre, i microrganismi possono essere utilizzati in diverse applicazioni: dalla produzione di farmaci salvavita, alla produzione di biocarburanti, dal biorisanamento di ambienti inquinati alla produzione e lavorazione di cibi e bevande (McGenity *et al.*, 2020).

I primi studi di Pasteur sulla generazione spontanea e quelli di Pasteur e Koch sulla natura delle malattie infettive che colpiscono animali e piante hanno rappresentato le basi della Microbiologia e hanno fornito il punto di partenza per la scoperta dei batteriofagi. (Chandler, 2008). Lavorando con *Escherichia coli*, i ricercatori hanno decifrato la natura e le funzioni di DNA, RNA e proteine, sviluppando così una serie di tecnologie per lo studio di queste

macromolecole e ponendo le basi della microbiologia molecolare, dell'ingegneria genetica e delle biotecnologie molecolari. Gli studi sui batteriofagi (virus batterici), quelli sui plasmidi e l'individuazione dei sistemi di restrizione-modificazione nei batteri sono stati fondamentali per la scoperta degli enzimi di restrizione e per lo sviluppo dei vettori usati nella clonazione molecolare, strumenti essenziali per la manipolazione del DNA. La scoperta degli archea termofili e gli studi sulla DNA polimerasi di *Thermus aquaticus* hanno inoltre consentito a Kary Mullis nel 1985 di sviluppare la tecnica della reazione a catena della polimerasi, nota come PCR (Polymerase Chain Reaction), uno strumento potentissimo per la manipolazione e l'analisi del DNA *in vitro* (Dehò & Galli, 2019).

Più recentemente, studiando il meccanismo con cui molti procari sviluppano resistenza all'attacco dei batteriofagi, è stato caratterizzato il cosiddetto sistema CRISPR-Cas una sorta di immunità acquisita grazie alla quale un microrganismo distrugge in modo specifico il DNA di un virus che lo ha infettato. Modificando opportunamente le componenti di un tipo specifico di questo sistema, il CRISPR-Cas9, è poi stata sviluppata una tecnologia che permette virtualmente di modificare *in vivo* il genoma di qualsiasi organismo in modo molto semplice e con grande precisione; questa applicazione sta rivoluzionando i protocolli di manipolazione genetica e ne sta ampliando le potenzialità (Dehò & Galli, 2019).

Tappa finale ed emblematica di questo percorso, che ha attraversato quasi tutto il XX secolo e che ha aperto nuovi orizzonti alla ricerca biologica, è stato il sequenziamento del DNA microbico e lo sviluppo degli approcci genomici allo studio dei sistemi biologici. Sono stati sequenziati i genomi di molti microrganismi di interesse clinico, industriale e ambientale: oggi, grazie allo sviluppo di tecnologie per il sequenziamento massivo parallelo quali l'NGS (Next Generation Sequencing), il sequenziamento di un genoma batterico risulta essere una procedura eseguita di routine nella caratterizzazione di un ceppo microbico (Dehò & Galli, 2019). La genetica microbica non è solo alla base della biologia molecolare, ma ha anche un ruolo fondamentale nella comprensione dei pathways metabolici e nella produzione di prodotti naturali, compresi gli antibiotici (Chandler, 2008). Con l'avvento delle tecnologie del DNA ricombinante e dell'ingegneria genetica a partire dagli anni Settanta del Novecento si sono, inoltre, sviluppate le moderne applicazioni biotecnologiche dei microrganismi, le quali si riferiscono a tutti quei processi di trasformazione della materia che, alcuni noti fin dall'antichità, trovano la loro origine nelle fermentazioni industriali (Dehò & Galli, 2019). Oggi le biotecnologie microbiche hanno superato questo ambito e possono essere più ampiamente definite come "processi caratterizzati dall'impiego integrato di biochimica, microbiologia e

ingegneria allo scopo di perseguire l'applicazione tecnologico-industriale delle capacità dei microrganismi, delle colture di cellule di tessuti e loro parti” (European Federation of Biotechnology). Le biotecnologie microbiche sono un settore eccezionalmente dinamico delle scienze biomediche, unico per la diversità dei prodotti e dei servizi che fornisce e a cui contribuisce. La Microbiologia ha trovato innumerevoli applicazioni pratiche in molte attività umane, volte soprattutto a migliorare la qualità della vita. Tra queste ricordiamo la prevenzione e la terapia delle malattie supportata dalla produzione di antibiotici, lo sviluppo e la produzione di nuovi farmaci, la diagnostica, la medicina legale, l'agricoltura e l'orticoltura, l'approvvigionamento alimentare e la nutrizione, la fermentazione industriale. Inoltre, viene impiegata nella produzione di energia da fonti rinnovabili, nella produzione di prodotti chimici e materiali, nel trattamento delle acque e dei rifiuti e nel riciclaggio, nei processi di biotrasformazione ecocompatibili (noti come *green chemistry* o chimica pulita), nei processi di biorisanamento ambientale basati su enzimi, microrganismi o consorzi microbici, nel monitoraggio e nella prevenzione della contaminazione ambientali attraverso lo sviluppo di pesticidi e polimeri biodegradabili (Timmis *et al.*, 2016; Dehò & Galli, 2019). Gli scienziati, oggi, sono persino in grado di utilizzare i microrganismi come vettori di clonazione per realizzare piante ibride e OGM e per produrre enzimi con differenti ruoli (National Research Council Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health, 2004).

Passo fondamentale nell'evoluzione della Microbiologia è stato lo sviluppo di tecnologie genomiche rapide e accessibili, di strumenti bioinformatici, di approcci di biologia sistemica e sintetica e di strumenti analitici e *imaging* ad alta risoluzione, grazie ai quali sono state aperte nuove strade di applicazione della Microbiologia. Alcune di queste, quali l'ingegneria del microbioma, le applicazioni bioenergetiche e bioelettriche, l'uso di tossine microbiche per impieghi terapeutici e cosmetici, promettono di rivoluzionare la nostra vita similmente a quanto fatto dallo sviluppo della tecnologia informatica (Timmis *et al.*, 2016).

La rilevanza dell'arricchimento presente e futuro del lavoro umano, della prosperità e del benessere che saranno portati dalle biotecnologie microbiche, così come il suo contributo nella risoluzione dei problemi che il nostro pianeta Terra sta affrontando, inizia solo ora a essere apprezzata (Timmis *et al.*, 2016).

### **1.3. La Microbiologia Forense: nuove scoperte e prospettive future**

La Microbiologia forense è stata definita come «una disciplina scientifica dedicata all'analisi delle prove relative a un atto di bioterrorismo, biocrimine o rilascio involontario di microrganismi e tossine da essi prodotte, a scopo di attribuzione» (Budowle *et al.*, 2003). L'uso illegale di agenti biologici si pone all'origine di pericoli sostanziali per gli individui, per la salute pubblica, per l'ambiente, per le economie delle Nazioni e per la pace globale (Committee on Science Needs for Microbial Forensics: Developing an Initial International Roadmap; Board on Life Sciences; Division on Earth and Life Studies; National Research Council, 2014).

Le sue iniziali applicazioni in circostanze di biocrimine, bioterrorismo ed epidemiologia, tuttavia, sono oggi accompagnate dalla prospettiva di impiegare metodi microbiologici per analizzare le prove coinvolte in una moltitudine di casi criminali (Allard *et al.*, 2017; Amorim, 2010; Budowle *et al.*, 2014; González-Candelas, 2017; González-Candelas *et al.*, 2013), utilizzando i microrganismi come prove accessorie, per chiarire le cause di morte (annegamenti, infezioni nosocomiali, tossicologia, morti infantili), per facilitare l'identificazione umana mediante i microbiomi di pelle, capelli e fluidi corporei, per geolocalizzare la scena del crimine attraverso l'analisi del microbioma del suolo e per stimare l'intervallo post-mortem (PMI) attraverso il necro-microbioma e la comunità microbica epinecrotica (Oliveira & Amorim, 2018).

La Microbiologia Forense è una disciplina nata dalla complementazione di conoscenze e competenze di microbiologia e di medicina legale (Kuiper, 2016) e risulta essere un campo piuttosto nuovo e ancor oggi in evoluzione (Lehman, 2012).

Le indagini microbiologiche forensi seguono essenzialmente il medesimo iter delle altre indagini forensi: l'osservazione della scena del crimine, le pratiche della catena di custodia, la raccolta, la manipolazione e la conservazione delle prove, il loro invio al laboratorio competente per essere analizzate, l'interpretazione dei risultati e la presentazione delle conclusioni in tribunale.

L'indagine microbiologica forense cercherà di determinare l'eziologia e l'identità dell'agente causale, seguendo una procedura simile a un'indagine epidemiologica, sebbene con una caratterizzazione a più alta risoluzione, attraverso test genetici e non, supportati da approcci informatici, con l'obiettivo di determinare la fonte unica di un campione o almeno di eliminare parte delle possibili fonti; analisi chimiche e fisiche, inoltre, contribuiscono a determinare il processo utilizzato per preparare, conservare o diffondere un'arma biologica. Infine, saranno necessarie partnerships con altri laboratori, perché molte delle figure professionali e delle

strumentazioni necessarie per l'analisi non sono presenti nel laboratorio forense tradizionale (Budowle *et al.*, 2005).

Due ulteriori aspetti fondamentali per la Microbiologia Forense sono il monitoraggio dei focolai di sviluppo di patogeni e la tossicologia: il rilascio di agenti patogeni e di tossine può essere intenzionale o dovuto a negligenza medica e l'applicazione di un protocollo di sorveglianza affidabile e robusto per il monitoraggio dei patogeni fornisce informazioni preziose per distinguere tra le due cause di diffusione (Oliveira & Amorim, 2018).

Quando si tratta di focolai di patogeni naturali è necessario attuare misure per prevenire l'insorgenza di altri casi di malattia: il successo di tali misure è legato alla quantità e alla qualità dei dati raccolti relativamente all'identificazione dei ceppi isolati, alla localizzazione di possibili fonti, serbatoi, vettori e ospiti intermedi nonché alla determinazione di vie di trasmissione o alle dinamiche di evoluzione (Schürch & Siezen, 2010).

Nel caso invece di un attacco bioterroristico, motivato da credenze ideologiche, politiche o religiose, un agente biologico viene rilasciato intenzionalmente con lo scopo di causare panico, vittime di massa o perdite economiche (Jansen *et al.*, 2014). Questi agenti *et al* possono essere utilizzati così come sono presenti in natura o essere ingegnerizzati geneticamente per una migliore diffusione di massa e una mortalità più elevata o per una maggiore resistenza ai medicinali e/o ai vaccini disponibili (Pavlin, 1999). Il rilievo della Microbiologia Forense nel bioterrorismo è emerso in concomitanza dei famosi attacchi postali del 2001 in America con *Bacillus anthracis*, da cui il nome identificativo "Amerithrax" (Rasko *et al.*, 2011); in seguito a questi eventi, il Dipartimento della Sicurezza Nazionale degli Stati Uniti ha istituito il *Bioforensics Analysis Center*, la principale istituzione di ricerca sulla biodifesa degli Stati Uniti in ambito biologico-forense (Lehman, 2012).

Il biocrimine, diversamente, consiste nell'utilizzo di un agente patogeno o di tossine come arma, con l'intento di danneggiare o causare panico in un individuo specifico o in un gruppo limitato di individui (Jansen *et al.*, 2014; Lehman, 2014). In questi casi risulta di primaria importanza stabilire la fonte d'origine del bioagente attraverso il confronto tra l'isolato trovato nelle vittime e quello associato ai perpetratori (Lehman, 2014).

Secondo lo *Human Microbiome Project* (HMP), un corpo umano sano contiene un numero dieci volte superiore di microbi rispetto al numero di cellule proprie: le comunità microbiche colonizzano diversi organi del corpo, giocando ruoli fondamentali sia nella salute umana sia nello sviluppo di malattie. Nonostante la vasta conoscenza scientifica sul ruolo delle comunità microbiche in un corpo vivente, al momento sono poco noti i cambiamenti microbici che

avvengono dopo la morte, inducendo così molti scienziati a studiare la composizione del necromicrobioma e le sue potenziali applicazioni in campo forense, mediante l'isolamento microbico da campioni di cadavere, per far luce sul ruolo delle indagini microbiologiche post-mortem nell'identificazione delle cause e nella determinazione del PMI (Ventura Spagnolo *et al.*, 2019).

### **1.3.1. L'analisi forense del DNA e la sua applicazione microbiologica**

Dalla sua introduzione più di 30 anni fa (Gill *et al.*, 1985), l'analisi forense del DNA ha assunto un ruolo sostanziale in casi civili e penali (Butler, 2015). La prova del DNA può essere utilizzata come testimone silenzioso per stabilire un collegamento tra la scena del crimine e particolari individui (sospettati e/o vittime) e/o oggetti. Questi collegamenti, basati sulla probabilità, sono originati dal confronto dei profili genetici e risultano spesso decisivi nel contribuire ad assolvere o condannare un sospettato (Budowle *et al.*, 2017; Butler, 2015). L'analisi genetica microbica risulta dunque essere uno strumento potenzialmente prezioso e dirimente.

Dagli anni Sessanta, l'ibridazione DNA-DNA (DDH) è stata lo standard di riferimento per l'identificazione delle specie batteriche. Nel 1987, Wayne *et al.* stabilirono uno standard di somiglianza DDH del 70% o superiore per l'attribuzione di ceppi alla stessa specie (Wayne, 1988). Controparte del DDH è l'identità nucleotidica media (ANI), un concetto che valuta l'identità nucleotidica tra le regioni genetiche condivise da due isolati e può identificare, senza ambiguità, la specie di un dato isolato a partire dal sequenziamento dell'intero genoma (whole genome sequencing - WGS) (Besser, 2018).

Prima dell'avvento delle tecniche basate sul DNA, alla fine degli anni Ottanta del Novecento, gli strumenti disponibili per l'individuazione e l'identificazione dei microrganismi erano limitati a metodi fenotipici associati a profili antigenici e/o di resistenza antimicrobica. Essi, dunque, consentivano solo la risoluzione a livello di genere e/o specie e utilizzavano tecniche dipendenti dalla coltura (Oliveira *et al.*, 2018). In seguito, i tradizionali metodi fenotipici sono stati sostituiti da quelli molecolari basati sugli acidi nucleici, quali il DNA fingerprinting, il sequenziamento del genoma intero e l'analisi del microarray (Budowle *et al.*, 2005; Pattnaik & Sekhar, 2008). È stato così possibile sostituire la caratterizzazione convenzionale degli agenti patogeni tramite morfologia, proprietà di colorazione e criteri metabolici con una definizione genomica dei patogeni (Behjati & Tarpey, 2013). Questi metodi innovativi, non essendo soggetti ai cambiamenti delle caratteristiche fenotipiche dovuti all'influenza di fattori ambientali, hanno migliorato la risoluzione tassonomica, cioè l'identificazione a livello di isolato/ceppo, e hanno ridotto il tempo che intercorre tra la raccolta del campione e l'ottenimento dei risultati (Pattnaik & Sekhar, 2008).

La rivoluzione nel sequenziamento del genoma batterico è avvenuta nel 1995 quando Craig Venter, Hamilton Smith e i loro collaboratori hanno eseguito il primo sequenziamento dell'intero genoma di un ceppo non patogeno di *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) utilizzando il metodo Sanger. Esso rappresenta una tecnica accurata, ma che richiede molto tempo, relativamente costosa e con un basso rendimento, caratteristiche che ne limitano l'applicazione al sequenziamento dell'intero genoma (ENCODE Project Consortium, 2012): risulta quindi difficoltoso ottenere specifiche sequenze di geni e, ancor più, genomi completi. I limiti del metodo Sanger sono stati superati nei primi anni 2000 con l'introduzione di tecnologie di sequenziamento ad alta produttività (HST) (Reuter *et al.*, 2015) o di seconda generazione, anche note come sequenziamento massivo parallelo (MPS) o sequenziamento di nuova generazione (NGS - next generation sequencing) (Yang *et al.*, 2014).

Negli anni, si è osservato un uso sempre crescente dell'NGS rispetto al convenzionale metodo Sanger (Bano *et al.*, 2015; Clarke *et al.*, 2017; Schmedes *et al.*, 2017), grazie agli innumerevoli vantaggi forniti: (i) la capacità di sequenziare singoli isolati con assemblaggio *de novo*; (ii) il *read mapping*; (iii) il sequenziamento mirato di geni specifici o di altre regioni di interesse (Sijen, 2015); (iv) la metagenomica (Børsting & Morling, 2015; Franzosa *et al.*, 2015); (v) la sua elevata produttività che permette di completare in parallelo centinaia di milioni di reazioni di sequenziamento, ottenendo un intero genoma batterico in solo una o due *runs*; (vi) l'esistenza di un protocollo unico applicabile a tutti i microrganismi per l'identificazione e la genotipizzazione; (vii) la non esigenza del clonaggio dei frammenti di DNA da sequenziare, né di una conoscenza a priori della sequenza di un particolare gene/genoma - poiché consente di leggere tratti di DNA stampo distribuiti in modo casuale nel genoma - né di una separazione elettroforetica per determinare la sequenza - poiché i nucleotidi vengono incorporati nella reazione di sequenziamento e simultaneamente identificati; (viii) il superamento della necessità di isolamento e coltura del microrganismo (metodo coltura-indipendente), permettendo di analizzare anche i ceppi che non crescono in terreni di coltura, evitando i bias derivanti dalle limitazioni delle colture stesse, e di identificare anche i microrganismi presenti in piccole tracce non rilevabili con i metodi convenzionali; (ix) la possibilità di utilizzare micro- e nano-reattori, normalmente immobilizzati su un supporto solido, permettendo un elevatissimo livello di parallelizzazione; (x) la riduzione sia dei costi sia del tempo di risposta (solo poche ore), la quale ha reso questo metodo ampiamente disponibile (Oliveira *et al.*, 2018; Schmedes *et al.*, 2016; Amaldi *et al.*, 2018).

Con queste tecnologie, il sequenziamento si è reso, infatti, disponibile anche per la batteriologia e il costo totale per sequenziare un genoma batterico completo è diventato più accessibile nel