

l'ambiente ma anche in casi di trasmissione animale-uomo per una rapida indagine epidemiologica.

S5.4

TECNICHE MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI INFEZIONI DA MICRORGANISMI MULTI-RESISTENTI IN PAZIENTI CRITICI

Stefani S.

Dipartimento di Scienze Microbiologiche
Università degli Studi di Catania
Email stefanis@unicat.it

L'identificazione rapida e specifica di batteri patogeni, nel trattamento di pazienti critici, rappresenta spesso l'evento cruciale nella diagnosi e nell'esito di infezioni gravi, principalmente nei reparti a rischio. Le metodiche microbiologiche tradizionali stanno gradatamente lasciando il passo all'avvento delle tecniche molecolari, grazie alla loro maggiore sensibilità e specificità e alla rapida capacità di predizione.

Gli strumenti della biologia molecolare sfidano i test diagnostici più avanzati: sono a disposizione parecchi tests commerciali e non, basati sulle tecniche della PCR (amplificazione genica di specifici geni target e loci universali come il gene della 16S rRNA), dell'ibridazione genica (polimorfismi di regioni geniche altamente conservate come i geni housekeeping) e dell'ibridazione normale ed *in situ* (FISH) che consentono lo screening di un'ampia varietà di fattori genetici direttamente dal materiale patologico, aumentando non solo la sensibilità, ma riducendo drasticamente il tempo necessario per l'identificazione dei patogeni e i loro quadri di resistenza. Inoltre, tecnologie avanzate come la PCR-Real Time, il sequenziamento genico e i microarrays stanno creando nuove opportunità di sviluppo nel campo della microbiologia molecolare.

Comparate con le normali tecniche fenotipiche tradizionali, le nuove tecnologie molecolari, basate sull'analisi del DNA, hanno i seguenti vantaggi:

- i) individuazione diretta e rapida identificazione di microrganismi che crescono lentamente o di germi particolarmente esigenti, difficili da coltivare *in vitro*;
- ii) possibilità di intraprendere studi epidemiologici, attraverso tecniche di:
 - i) typing molecolare, mediante l'analisi dei polimorfismi dell'intero genoma o di specifiche regioni geniche (PFGE, RAPD, AFLP);
 - ii) caratterizzazione mediante metodologie basate sulla sequenza degli acidi nucleici (MLST);
 - iii) identificazione di markers genici di resistenza per specifiche classi di antibiotici.

L'interpretazione del risultato di tests diagnostici molecolari, così come per i tests immunologici, deve essere criticamente valutato in relazione alla situazione clinica del paziente.

S5.5

IDENTIFICAZIONE DI BATTERI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO GENICO

Visca P.

Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tre e Istituto Nazionale di Malattie Infettive IRCCS "Lazzaro Spallanzani", Roma

L'identificazione rapida e certa di un agente infettivo è l'obiettivo principe della diagnostica microbiologica ed ha ricadute dirette sulla qualità della gestione clinica dei pazienti. L'introduzione delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici nella routine microbiologica ha contribuito in misura considerevole al raggiungimento di tale obiettivo. La parallela evoluzione tecnologica, le semplificazioni metodologiche, l'abbattimento dei costi di esercizio e la creazione di risorse informatiche in rete hanno reso accessibili le procedure di identificazione e tipizzazione su base genetica ad una sempre più vasta utenza. I metodi convenzionali, culturali e biochimici, possono fallire nell'identificare microrganismi con caratteristiche fenotipiche inusuali e non possono essere applicati a microrganismi difficilmente coltivabili o non coltivabili. La potenza diagnostica delle tecniche di sequenziamento si basa sui solidi fondamenti di genetica evolutiva applicabili a tutti i taxa, garantendo in tal modo la precisa allocazione tassonomica di qualsivoglia microrganismo, sia esso un eubatterio, un archea o un micete. In questa presentazione sarà illustrato l'utilizzo di tecniche di sequenziamento genico in microbiologia diagnostica. Saranno descritti i principi guida nell'identificazione microbica mediante tecniche di sequenziamento dei geni codificanti gli RNA ribosomiali (rDNA *sequence-based identification*), il percorso analitico di base e l'evoluzione della metodica come conseguenza del miglioramento tecnologico (Kolbert & Persing, 1999, *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:299; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). Saranno commentati dei casi clinici esemplari il cui successo diagnostico è dipeso dall'applicazione di tali tecniche. Una fine allocazione tassonomica dei microrganismi patogeni gioca un ruolo critico anche nell'epidemiologia delle malattie infettive, garantendo la tracciabilità di cloni al fine di un loro controllo. Le grandi maggioranze delle tecniche di epidemiologia molecolare si basano sull'analisi della migrazione elettroforetica di frammenti di DNA generati da macrorestrizione di genomi o da

amplificazione di definite regioni di questi. Negli ultimi 5 anni è stata ideata ed applicata ad un vasto repertorio di specie batteriche una nuova tecnica di tipizzazione basata sul sequenziamento di alcuni geni vegetativi (*MultiLocus Sequence Typing*, MLST; Urwin & Maiden, 2003, *Trends Microbiol.*, 11:479; <http://pubmlst.org/>). La variabilità allelica in tali geni consente di definire un ceppo batterico attraverso un codice numerico unico. La tecnica è dotata di potere discriminatorio e riproducibilità elevati, essendo basata su dati di sequenza piuttosto che su dimensioni di frammenti di DNA. Questa caratteristica rende la tecnica assolutamente svincolata dalla piattaforma analitica (sequenziatore). La MLST trae vantaggio dalla combinazione di tecnologie di sequenziamento avanzate e di approcci bioinformatici per lo studio della genetica di popolazioni, offrendosi come uno strumento universale nello studio della struttura di popolazioni. Ad oggi sono stati sviluppati schemi MLST molti microrganismi d'interesse clinico, ed i dati generati hanno contribuito in maniera sostanziale alla sorveglianza epidemiologica di importanti microrganismi patogeni.