

relazioni

SESSIONE 9

Biotechiche emergenti nella diagnostica microbiologica e virologica

Venerdì 11 giugno 2004, 9.00-13.00, Sala F

S9.1

APPLICAZIONI DELLA GENOMICA IN VIROLOGIA

Barzon L., Palù G.

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, Università di Padova

Con il sequenziamento del genoma di molti patogeni, le tecniche di analisi genomiche mediante DNA microarray e sonde molecolari si stanno dimostrando un valido strumento per l'identificazione e la tipizzazione dei microorganismi, per lo studio della loro fisiologia, dei fattori di virulenza, e delle interazioni con l'ospite, nonché per l'identificazione di nuovi bersagli molecolari per farmaci antivirali. Abbiamo applicato metodiche di analisi di farmacogenetica e farmacogenomica per lo studio del profilo di espressione genica in campioni biotipici di pazienti affetti da infezione da HIV-1, HCV, o HBV e sottoposti a terapia antivirale allo scopo di identificare geni coinvolti nella risposta alla terapia o nella manifestazione di eventi avversi. Più in particolare, per quanto riguarda i pazienti con infezione da HIV-1, abbiamo analizzando il tessuto adiposo sottocutaneo prelevato da pazienti affetti o non affetti da lipodistrofia e sottoposti a terapia anti-retrovirale HAART. Abbiamo dimostrato che alcuni geni codificanti per citochine prodotte da tessuto adiposo (adiponectina, resistina, TNF- α , leptina), per i recettori degli estrogeni e per l'aromatasi sono differenzialmente espressi nel tessuto lipodistrofico rispetto al tessuto adiposo sano e sono modulati dagli inibitori delle proteasi. Abbiamo inoltre dimostrato che i farmaci antiretrovirali provocano complesse alterazioni del pattern di espressione dei geni cellulari in un modello *in vitro* di differenziazione da preadipociti in adipociti. Per quanto riguarda l'infezione da virus dell'epatite, abbiamo applicato la tecnologia dei DNA microarray

allo studio di un'ampia casistica di tessuti epatici, ottenuti da pazienti con epatite cronica e/o epatocarcinoma correlati ad infezione da HBV o HCV e trattati con terapia medica. Questa analisi ci ha permesso di evidenziare i geni probabilmente implicati nella patogenesi della malattia, nella risposta alla terapia medica, o potenziali nuovi target terapeutici. Anche in questo caso, in modello cellulare *in vitro* viene impiegato per confermare i risultati osservati nei campioni clinici.

S9.2

PYROSEQUENCING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS

Lundeberg J.

Dept of Biotechnology, AlbaNova University Center, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden

As the complete genome sequence for a number of bacteria, higher organisms and humans are determined there is an emerging need for analysis of sequence variations as genetic markers in diagnosis, in cancer research and in pharmacogenomics. In order to meet this need, cost-effective, high-throughput and accurate techniques are required. For this reason the research activities at our department have developed two types approaches, a liquid based sequencing method, pyrosequencing and a microarray-based sequencing method, AMASE. Pyrosequencing is a non-gel based sequencing by synthesis method that interrogates the DNA sequence in an iterative manner. Successful incorporation of a nucleotide (A, G, C or T) into a DNA sequence template is measured in real-time by an enzymatic cascade that yields quantitative amounts of light that is measured by a CCD camera. The removal of nucleotides between cycles is achieved by the presence of apyrase that degrades non-incorporated nucleotides.

The microarray based method, AMASE, takes advantage of some of the components in the pyrosequencing concept but performs the assay on a microarray format and uses fluorescent nucleotides to identify genetic variations. The two formats complement each other by facilitating both a highly accurate systems as a well as high throughput system. The majority of the steps of these two methods are now automated using robotic systems developed in-house at the KTH Genome Center and here I will exemplify the use of these two principles in bacterial gene sequence analysis, monitoring of drug resistance and viral genotyping.

S9.3

SENSIBILITÀ AI FARMACI DEL MICOBATTERIO TUBERCOLARE: APPROCCIO GENOTIPICO CON L'IMPIEGO DI MICROCHIP

Tortoli E.

*Laboratorio di Microbiologia e Virologia-
Ospedale di Careggi, Firenze*

Con il diffondersi del fenomeno delle multiresistenze la determinazione della sensibilità del bacillo tubercolare ai farmaci è diventata una necessità imprescindibile. I tempi occorrenti sono tuttavia lunghi, tanto che, anche utilizzando le tecnologie più aggiornate, non sempre è possibile disporre dei risultati prima di quattro settimane. L'approccio genotipico alla determinazione della sensibilità ai farmaci trova pertanto nei micobatteri un campo di applicazione privilegiato. Il limitato numero di farmaci disponibili per la terapia della tubercolosi potrebbe far pensare ad una strategia non troppo complessa, senonché, a causa della presenza di più di un meccanismo di resistenza per ciascuno di essi, il numero di marker genetici da monitorare risulta comunque elevato. L'unica eccezione è costituita dalla rifampicina dal momento che le resistenze nei suoi confronti sono associate, in oltre il 97% dei casi, a mutazioni all'interno del gene *rpoB*. Per gli altri farmaci la proporzione dei ceppi resistenti contrassegnati dallo stesso marker genetico non supera in nessun caso il 60% ed emblematico è il caso dell'isoniazide per la quale, a differenti meccanismi di resistenza, si associano mutazioni che coinvolgono almeno tre diverse regioni geniche. La necessità di monitorare un elevato numero di geni, ciascuno dei quali con un ampio spettro di possibili mutazioni, ha di fatto reso fin'ora utopistico (eccezione fatta per la rifampicina per la quale è disponibile anche un kit commerciale) l'obiettivo della determinazione a livello genotipico delle resistenze del bacillo tubercolare. La tecnologia dei microarray, aprendo la possibilità di monitorare

simultaneamente un elevato numero di mutazioni grazie all'impiego di altrettante sonde apre una prospettiva nuova. I vari modelli di array e le possibili strategie di impiego saranno oggetto di discussione.

S9.5

TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE REAL-TIME NELLA DETERMINAZIONE DELLA CARICA VIRALE: PARVOVIRUS B19 E PAPPILLOMAVIRUS UMANI

Gallinella G.

Università di Bologna

Il recente sviluppo delle tecniche di PCR real-time quantitativa ha consentito di ampliare considerevolmente la rilevanza diagnostica della determinazione della presenza di acidi nucleici virali in un campione clinico. Infatti, alla semplice determinazione qualitativa della presenza di un virus, si è affiancata la possibilità di una determinazione quantitativa del carico virale, che a sua volta consente di definire con maggiore precisione il ruolo patogenetico del virus nelle diverse situazioni cliniche. Come modelli applicativi, tecniche di PCR real-time possono essere utilizzate per la ricerca e valutazione quantitativa di parvovirus B19 e papillomavirus umani.

La diagnosi virologica di infezione da parvovirus B19 è prevalentemente rivolta alla ricerca degli acidi nucleici virali nel sangue, come dimostrazione della fase viremica dell'infezione, nei tessuti, come dimostrazione della presenza ed espressione del virus, e infine nei fluidi e tessuti fetali per dimostrare un'avvenuta infezione intrauterina. La determinazione quantitativa del carico virale fornisce informazioni che possono meglio definire il quadro clinico in rapporto alla fase di infezione, se acuta, recente oppure persistente. Inoltre, la determinazione quantitativa del carico virale presente in unità di sangue destinate ai servizi trasfusionali, oppure di plasma per la produzione di emoderivati, costituisce un'efficace misura profilattica per impedire la trasmissione di infezioni iatrogene.

Il monitoraggio in tempo reale della quantità di prodotto di amplificazione è ottenuto mediante sistemi ottici in grado di rivelare la fluorescenza emessa da un fluorocromo intercalante (SybrGreen), oppure della fluorescenza emessa da fluorofori legati a sonde oligonucleotidiche che assicurano un riconoscimento specifico dell'amplificato (sonde FRET, TaqMan, Molecular Beacons). La valutazione quantitativa si basa sulla determinazione della fase lineare dell'accumulo di prodotto seguita dalla determinazione per ciascuna reazione di un ciclo soglia, correlato alla quantità di bersaglio iniziale. I metodi di calibrazione della