

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

determinazione quantitativa mediante real-time PCR assumono particolare rilevanza nel caso del parvovirus B19. La determinazione quantitativa può essere ottenuta mediante una serie di standard di numero di copie bersaglio, che consente la costruzione di una curva di calibrazione esterna e quindi la quantificazione del campione per interpolazione sulla curva di taratura. In maniera più corretta, si può fare riferimento a sistemi di calibrazione che utilizzano bersagli di riferimento interni, amplificati da coppie di primer diverse rispetto alle coppie che amplificano il bersaglio virale, ottenendo un sistema di quantificazione relativa ad un campione noto che funge da calibratore. Infine, un bersaglio competitore può essere coamplificato in una reazione di PCR e rivelato in real-time se il sistema è in grado di rivelare contemporaneamente l'emissione luminosa di diversi fluorofori.

Per quanto riguarda la ricerca del DNA di papillomavirus umani mediante tecniche di PCR, le informazioni possono riguardare la presenza del DNA virale, la sua genotipizzazione, la determinazione della carica virale e la eventuale definizione dello stato di integrazione nel genoma cellulare. Le tecniche maggiormente in uso prevedono l'amplificazione mediante l'utilizzo di primer di consenso, seguita da un riconoscimento degli amplificati mediante sonde genotipo-specifiche, che permettono una tipizzazione virale, importante perché correlata ad un diverso rischio di sviluppo di lesioni neoplastiche. Una PCR real-time quantitativa che utilizza primer di consenso per numerosi genotipi fra quelli a maggior rischio oncogeno, è quindi in grado di fornire informazioni sia sulla presenza del DNA virale, sia sulla carica virale, indicativa del rischio di progressione neoplastica della lesione. Una genotipizzazione è quindi possibile sia mediante l'uso di primer che di sonde genotipo-specifiche. L'ulteriore aspetto di rilevanza riguarda il possibile stato integrato del genoma virale per alcuni genotipi ad alto rischio oncogeno, evento implicato nella progressione delle lesioni pre-neoplastiche a carcinomi invasivi. In questo caso le tecniche di PCR real-time possono fornire informazioni quantitative riguardo al rapporto numerico fra genomi virali allo stato episomiale rispetto allo stato integrato.