

relazioni

SESSIONE 5

La diagnostica molecolare in batteriologia: attualità e prospettive

Mercoledì 20 Settembre 2006, ore 09.00-13.00, Sala GIALLA

S5.1

L'EVOLUZIONE DELLA BATTERIOLOGIA ALLA LUCE DELLA BIOLOGIA MOLECOLARE

Cassone A.

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

La diagnostica microbiologica continua a costituire, insieme allo sviluppo diagnostico in altri settori (vedi oncoproteomica) la vera rivoluzione nelle malattie infettive, in alto contrasto con la scarsità di nuovi antibiotici e approcci terapeutici e le usuali difficoltà e lentezze nella generazione ed uso di nuovi vaccini.

Le prospettive sono chiare: una diagnosi comprensiva di vari agenti microbici su sistemi miniaturizzati e di facile esecuzione e lettura nel laboratorio se non a letto del paziente.

Questa prospettiva non data fra 20 o 30 anni bensì fra 3 - 5 anni: rimangono insoluti e richiedono attenta considerazione i problemi di validazione dei diversi arrays genomici e proteomici nonché la sempre difficile integrazione fra i dati di laboratorio e l'esperienza clinica.

S5.2

IDENTIFICAZIONE RAPIDA DI AGENTI DI BIOTERRORISMO IN SITUAZIONI DI EMERGENZA

Carattoli A.

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immuno-Mediata, Istituto Superiore di Sanità-Roma

In accordo con le linee guida internazionali (Centers

for Disease Control and Prevention, CDC) e nazionali (Istituto Superiore di Sanità, ISS), la diagnosi microbiologica di patogeni batterici di classe A potenzialmente utilizzati a scopo bioterroristico è organizzata in livelli progressivi di accertamento e conferma. Nel caso di sospetto isolamento di patogeni tipo *Bacillus anthracis* o *Yersinia pestis*, i ceppi vengono analizzati per la conferma definitiva da un laboratorio di riferimento nazionale. Durante l'attacco bioterroristico negli USA, in Italia sono state elaborate linee guida per il potenziamento diagnostico di agenti patogeni potenzialmente utilizzabili a scopo bioterroristico ed è stata creata una rete di laboratori di riferimento in grado di fornire una diagnosi definitiva ed eventualmente una tipizzazione molecolare dei ceppi isolati. In questo ambito, il gruppo di lavoro sul bioterrorismo ISS ha messo a punto metodi molecolari basati sull'amplificazione per PCR ed ibridazione con sonde specifiche (Real-time PCR) per il riconoscimento e la caratterizzazione di *B. anthracis* e *Y. pestis*. In particolare, è stato messo a punto un protocollo diagnostico basato sulla rilevazione diretta di spore di *B. anthracis* nei tamponi nasali, mediante arricchimento in brodo, sterilizzazione in autoclave e rilevazione di geni specifici per Real-time PCR. Sono state disegnate coppie di primer utili all'identificazione definitiva di *B. anthracis* e *Y. pestis*. Altri primers sono utilizzati per discriminare il ceppo Sterne (ceppo vaccinale veterinario) dai ceppi selvatici isolati in Italia e dal ceppo Florida isolato negli USA dal primo caso di antrace polmonare nel 2001. Sono anche disponibili sonde che distinguono il *B. anthracis* da altre specie del genere *Bacillus*, compreso il *B. cereus* e amplificazioni specifiche per il riconoscimento rapido di *Yersinia* di altre specie più comuni dalla *Y. pestis*.

Per la tipizzazione dei ceppi sono state messe a punto tecniche innovative di rilevazione di loci polimorfici nel genoma di *B. anthracis* e di *Y. pestis*. Questo tipo di analisi è utilizzabile in caso di attacco bioterroristico come indagine per la ricerca della sorgente e per la comparazione di ceppi isolati dai vari casi clinici e dal-

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 basata 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 su dei solidi fondamenti di genetica evolutivistica 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 grande maggioranza delle tecniche di epidemiologia molecolare si basa sull'analisi della migrazione elettroforetica di frammenti di DNA generati da macrorestrizione di genomi o da