

**CPC.3****EVOLUZIONE DELLE TECNICHE DI AMPLIFICAZIONE****Garlaschi M.C., Gava G.**

Laboratorio Centrale di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologia. Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena

Le tecniche di Biologia Molecolare sono oggi utilizzate oltre che per la diagnosi e per la tipizzazione batterica, anche per la evidenziazione delle resistenze.

I vantaggi che derivano dall'utilizzo di tale metodica sono molti, infatti la rapidità di risposta in molti casi è veramente utile per la diagnosi, soprattutto per quei microrganismi che sono difficilmente coltivabili o a lenta crescita; non dimentichiamo inoltre l'elevata specificità e sensibilità di questa tecnica. Esistono purtroppo ancora delle ombre pensiamo per esempio al costo elevato dei reagenti, agli spazi dedicati e al personale specializzato e di conseguenza al rapporto costo/beneficio.

Le tecniche a tutt'oggi esistenti sono utilizzate:

- per identificare il patogeno direttamente nei materiali biologici
- per identificare geni di resistenza
- per identificare i microrganismi da coltura (ribotipizzazione, sequenziamento)
- per tipizzare i microrganismi.

I kits più commercializzati sono quelli che mettono in evidenza due patogeni responsabili di malattie sessualmente trasmesse: *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Recentemente si sono rese disponibili metodiche molecolari per tre patogeni delle vie respiratorie: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *legionella pneumophila*.

La ricerca di tali microrganismi, che era possibile fino a pochi anni fa solamente con metodi di PCR o Nested PCR (doppia amplificazione), ora può essere effettuata mediante metodi in Real time PCR. Questa tecnologia permette di quantizzare il microrganismo in tempo reale e di conseguenza darà un valido contributo al monitoraggio della terapia antibiotica.

Il prossimo futuro sarà quello di ricercare i patogeni responsabili di infezione presenti nel materiale in esame. La strategia potrebbe essere quella di utilizzare primers universali 16S rRNA, amplificare e identificare mediante sequenziamento l'amplificato. Le ombre sono ancora molte, ma soltanto l'utilizzo, di tali tecniche. con le problematiche che ne conseguono e gli sforzi congiunti per superarle, ci permetteranno di sfruttarne pienamente i vantaggi.

**CPC.4****LE METODICHE DI SEQUENZIAMENTO: APPLICAZIONE IN MICROBIOLOGIA CLINICA****Crovatto M.**

Struttura Semplice Dipartimentale di Biologia Molecolare - Dipartimento di Medicina di Laboratorio Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli, Pordenone

Il sequenziamento del DNA ha rappresentato una delle tappe fondamentali per lo studio dei processi biologici e delle biodiversità. In campo microbiologico si è rivelato estremamente importante per individuare nuovi patogeni, migliorare la diagnostica delle malattie infettive note, individuare e capire le interrelazioni tra le comunità microbiche che vivono nel corpo umano e sulla sua superficie, valutare in maniera più accurata ed approfondita l'epidemiologia delle malattie infettive.

La messa a punto di sistemi rapidi (cycle sequencing, pyrosequencing, sequenziamento basato sull'elettroforesi capillare, Open Gene System) applicabili su vasta scala ha sensibilmente accelerato l'applicazione del sequenziamento nella routine di un laboratorio di microbiologia, basti pensare ad esempio alla genotipizzazione di HCV e di HBV ed al rilevamento delle resistenze di HBV e HIV ai farmaci antivirali, già ampiamente diffusi in molti laboratori ed essenziali per la gestione della terapia. L'identificazione di microrganismi sulla base della sequenza, applicabile già ora in diverse situazioni, costituisce un'ulteriore mezzo che nell'immediato futuro potrebbe trovare applicazione soprattutto per i microrganismi di difficile coltivazione o a crescita molto lenta. Sulla base delle seguenti premesse ci si propone di:

- fare un'analisi critica delle metodiche di sequenziamento disponibili e delle varie possibilità di applicazione nella microbiologia clinica
- fare un excursus sulle nuove metodologie di sequenziamento (es. nanopore sequencing) e delle relative potenzialità
- illustrare alcune esperienze personali di sequenziamento per la genotipizzazione di HCV e di HBV ed il rilevamento delle resistenze di HBV
- discutere in maniera interattiva i dati e le problematiche relative alle metodologie