

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

pressione del sistema immunitario.

Le varie ipotesi relative ai meccanismi di entrata del virus nella cellula ed ai meccanismi di consolidamento della sua presenza con conseguente persistenza ed evoluzione dell'infezione verso la cronicizzazione, verranno discussi alla luce delle acquisizioni più recenti.

CD81: membro della famiglia delle tetraspanine

- 4 domini transmembrana
 - corti domini intracellulari
 - 2 loops extracellulari:
 - SEL (small extracellular loop)
 - LEL (large extracellular loop): contiene motivi caratteristici, in particolare CCG (cisteina-cisteina-glicina) coinvolti nella formazione di legami disolfuro
- LEL: 2 sottodomini
- Sottodominio conservato di 3 eliche (blu)
 - Sottodominio variabile di 2 eliche che si inserisce sul dominio conservato (rosse)

ARCHITETTURA DEL RECETTORE:

Le tetraspanine formano associazioni laterali con diversi tipi di molecole (P) ed anche tra di loro (T) per formare complessi multimolecolari definiti "TETRASPANIN WEBS"

SR-BI o Scavenger Receptor class B type I

Glicoproteina di superficie di 509 aa, espressa in molti tessuti dei mammiferi e tipi cellulari ma soprattutto nel fegato, surrenali ed ovaio. Si lega a LDL (lipoproteine acetilate e bassa densità) e HDL (lipoproteine ad alta densità). È un multiligando

- 2 corti domini citoplasmatici
- 2 domini transmembrana

SR-BI umano: contiene 9 potenziali siti di N-glicosilazione e 6 cisteine

Interazione con sE2 specifica, ma non diretta (secondo i dati ottenuti "in vitro")

L'interazione con il recettore sembra avvenga a livello di HVR-1 (*modula verosimilmente l'infettività*) di HCV aiutando l'interazione E2-SR-BI direttamente o indirettamente

LECTINE DI TIPO C

DC-SIGN: recettore di adesione per stabilire le interazioni cellulari tra cellule dendritiche e cellule T o cellule endoteliali. E' anche un recettore per l'antigene che internalizza dopo il legame in modo da veicolare l'antigene al compartimento endosoma/lisosoma per la presentazione alle cellule T. *E' espressa sulle cellule dendritiche*

L-SIGN: stabilisce le interazioni cellulari con le cellule T. E' espressa sulle cellule endoteliali sinusoidali nel fegato e nei linfonodi

Sia DC-SIGN che L-SIGN riconoscono strutture di carboidrati sui patogeni

HCV si lega alle cellule che esprimono DC-SIGN ed L-SIGN che però non sono presenti sugli epatociti, per cui sicuramente non costituiscono il recettore per que-

ste cellule. Potrebbero contribuire all'attecchimento o alla persistenza dell'infezione sia "catturando" e riversando particelle virali nel fegato sia modulando le funzioni delle cellule dendritiche

ASIALOGLICOPROTEINE: lectina di tipo C comunemente presente nel fegato. Da determinare il reale ruolo nella penetrazione di HCV nella cellula

RECETTORE LDL (Low-Density Lipoproteins)

Media l'internalizzazione di HCV legandosi alle particelle LDL associate al virione. Ruolo da confermare

GLICOSAMINOGLICANI

Le catene di glicosaminoglicani sui proteoglicani della superficie cellulare forniscono i siti per il legame di diversi virus alle cellule. Nel caso di HCV il legame tra la proteina E2 ed eparan solfato possa servire quale sito di attacco iniziale a cui segue il trasferimento ad un secondo recettore ad alta affinità. Non tutti gli studi confermano questo dato, per cui il problema resta ancora da chiarire.

- CD81 è essenziale per l'ingresso di HCV nella cellula
- Non noto l'esatto ruolo di SR-BI, sembra però intervenga nel modulare l'entrata
- Non è chiaro a quale stadio dell'entrata viene richiesto SR-BI
- SR-BI internalizza alcuni dei suoi ligandi, per cui potrebbe essere in grado di trafficare virioni di HCV a compartimenti a pH inferiore dove può avvenire la fusione di HCV
- SR-BI modula la composizione della membrana cellulare per cui potrebbe permettere l'entrata di HCV tramite modulazione della componente lipidica
- L'espressione di CD81 ed SR-BI su cellule non epatiche non permette l'ingresso di HCV e questo dimostra che sono necessarie molecole aggiuntive, espresse solo a livello della cellula epatica

preclinica (*screening*).

Le caratteristiche del processo di Technology Assessment

Gli ambiti presi in considerazione da un processo di valutazione delle tecnologie sanitarie sono numerosi e riguardano fattori quali l'efficacia attesa, l'efficacia nella pratica clinica, l'utilità clinica di un test diagnostico, le sue caratteristiche tecniche e di sicurezza, la sua applicabilità, i costi e i vantaggi di scelte terapeutiche che ne derivano. Nell'esaminare ed analizzare la letteratura in relazione alla decisione di introdurre, ad esempio, un nuovo test diagnostico nella pratica clinica, è necessario verificare l'esistenza di tre requisiti fondamentali:

- 1) la validità dei risultati degli studi esaminati;
- 2) le caratteristiche di questi risultati;
- 3) la loro trasferibilità o utilizzo nella propria pratica clinica. In questa prospettiva, le tecnologie che assumono particolare importanza ai fini del processo di valutazione, sono riconducibili a due gruppi:

- 1) tecnologie a "basso costo" (in relazione alla loro diffusa utilizzazione e soprattutto al loro abuso nella pratica clinica),
- 2) Tecnologie cosiddette emergenti.

Un esempio può essere rappresentato dalla recente diffusione delle tecniche di biologia molecolare e del loro utilizzo nella pratica clinica, soprattutto in diagnostica microbiologica. Le caratteristiche di queste tecnologie configurano la necessità di definire criteri di appropriatezza sia della fase analitica (scelta della tecnica utilizzata da parte dei diversi laboratori), che della fase pre-analitica (appropriatezza della richiesta), che della fase post-analitica (appropriatezza del referto), finalizzata ad una corretta applicazione clinica, spesso non riscontrata nelle scelte di clinici e patologi clinici.

Le diverse tipologie di technology assessment (TA).

Un processo di valutazione di tecnologia sanitaria ha sempre e comunque tre aspetti: un aspetto tecnologico ("*technology oriented*"), un aspetto orientato ad un determinato programma o progetto ("*project oriented*") e un aspetto orientato ad un problema ("*problem oriented*").

Una procedura di valutazione accreditata (National Information Center on Health Services Research and Health Care Technology -NICHSR; NIH) identifica 6 livelli di valutazione nel processo di Technology Assessment (TA) relativo ad un procedura diagnostica:

Livello 1: qualità tecnica

Livello 2: accuratezza diagnostica, sensibilità e specificità

Livello 3: cambiamenti indotti nel comportamento clinico

Livello 4: effetti sul profilo assistenziale

Livello 5: effetti sull' "*outcome*" del paziente

Livello 6: costi complessivi

In base a questa metodologia, la valutazione di una tecnologia diagnostica è effettuata secondo una scala gerarchica coerente che parte dagli aspetti di qualità tecnica, passa attraverso i cambiamenti indotti nel comportamento clinico rispetto all'uso di quella pratica diagnostica fino ai costi che ne derivano. I primi due livelli identificano un processo di *TA-technology oriented*, mentre i livelli successivi sono correlabili complessivamente ad un processo di valutazione *project-oriented*, il livello 3 e 4 è relativo ad un processo di valutazione

problem-oriented. Pertanto, un esempio di *TA-technology oriented* può essere costituito da una valutazione degli studi di accuratezza diagnostica. Un processo *TA-project-oriented*: si caratterizza, invece, per essere orientato a valutare l'adozione di una nuova tecnologia e/o la sostituzione di una metodica precedentemente utilizzata, seguendo una metodologia di valutazione e una procedura organizzativa di adozione. Una valutazione di *TA-problem-oriented*: consiste nell'esaminare i problemi e le conseguenze derivanti da un costante utilizzo nella pratica clinica di una determinata tecnologia diagnostica.

Conclusioni. È evidente che l'introduzione di una sistematica valutazione delle tecnologie sanitarie nei diversi contesti clinici ed assistenziali è opportuna e necessaria, in quanto consente di orientare e qualificare il processo diagnostico e terapeutico, anche in relazione alle risorse disponibili. È altresì evidente che i processi di valutazione delle tecnologie sanitarie così come delineati non sono di facile attuazione, in quanto necessitano di una applicazione graduale e, probabilmente, esistono una serie di barriere ed ostacoli al cambiamento. Barriere che possono essere ambientali e che riguardano la pratica clinica corrente, i limiti temporali, i limiti organizzativi.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Sox H., Stern S, Owens D, Abrams HL. Assessment of diagnostic technology in Health Care-Rationale for assessment diagnostic technology. *National Academy Press. Washington DC 1989; pag 8-22.*
- 2) Fryback DG, Thourbury JR: The efficacy of the diagnostic imaging *MedDecis Making 1991; 11(2):88-94*
Battista RN: la valutazione delle tecnologie sanitarie *Epid Prev 1994;18:15-21.*
- 3) Jaeschke R, Guyatt G, Sackett D: User's Guides to the Medical Literature How to Use an Article About a Diagnostic Test *JAMA 1994;271(9): 703-7*
- 4) Jenkins SG: Evaluation of new technology in the clinical microbiology laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis 1995 ;23(1-2): 53-60*
- 5) Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, et al. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *JAMA 1996;276:637-9.*
- 6) Moher D, Jones A, Lepage L. Use of the CONSORT statement and quality of reports of randomized trials. A comparative before-and-after evaluation. *JAMA 2001;285:1992-1995.*
- 7) Sackett DJ et al. The architecture of diagnostic research. *BMJ 2002; 324: 539-41*
- 8) Lauria F.N.: Il processo di valutazione delle tecnologie utilizzate nel laboratorio di microbiologia: metodologie e criteri di riferimento. *Analysis 2003; 1: 84-108*
- 9) Bossuyt P M et al. for the STARD Group* Towards Complete and Accurate Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy: The STARD Initiative *Ann Intern Med.* 2003;138:40-44.
The STARD Group. Towards complete and accurate reporting of studies on diagnostic accuracy: the STARD initiative
<http://www.consort-statement.org/stardstatement.htm>