

2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



Biologia Molecolare e nuove tecnologie

M. Favarato

*ULSS13 – Mirano (Ve) Medicina di
Laboratorio – Biologia Molecolare*



2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



Primers 346, 348, 349
Ribosomal primers with broad coverage

Bacteroidetes

Bacteroides fragilis
Bacteroides thetaiotaomicron
Capnocytophaga canimorsus
Chryseobacterium meningosepticum
Prevotella denticola
Porphyromonas gingivalis

Spirochetes

Borrelia burgdorferi
Borrelia hermslii
Borrelia turicatae
Leptospira interrogans
Treponema pallidum

Actinobacteria

Mycobacterium tuberculosis

Mycobacterium avium
Mycobacterium bovis
Mycobacterium kansasii
Mycobacterium chelonae
Mycobacterium fortuitum
Mycobacterium genavense
Mycobacterium leprae
Mycobacterium spp.
Mycobacterium simiae
Mycobacterium szulgai
Mycobacterium scrofulaceum
Mycobacterium ulcerans
Mycobacterium xenopi
Nocardia asteroides
Nocardia nova
Rhodococcus equi

Corynebacterium seriosus
Corynebacterium amycolatum
Corynebacterium bovis
Corynebacterium jeikeium
Corynebacterium sp.
Cor. pseudodiphtheriticum
Cor. diphtheriae

Propionibacterium acnes
Rothia dentocariosa
Tropheryma whippelii
Actinomyces israelii
Actinomyces naeslundii
Clavibacter michiganensis

Fusobacteria

Fusobacterium necrophorum
Streptobacillus moniliformis

Streptococcus viridans
Streptococcus bovis
Streptococcus equi

Streptococcus agalactiae
Streptococcus intermedius
Streptococcus milleri

Streptococcus pneumoniae
Streptococcus mitis
Streptococcus pyogenes

Bacillus anthracis

Bacillus cereus
Bacillus thuringiensis

Listeria monocytogenes

Staphylococcus intermedius
Staphylococcus saprophyticus

Primer 449

Chlamydia

Chlamydia trachomatis
Chlamydia psittaci
Chlamydia pneumoniae
Parachlamydia acanthamoebae

Campylobacter jejuni
Campylobacter fetus
Helicobacter cinaedi
Helicobacter fennelliae
Helicobacter pylori

Epsilon

Agrobacterium tumefaciens
Bartonella henselae
Bartonella quintana
Brucella abortus

Brucella melitensis
Brucella suis
Candidatus Liberibacter africanus
Candidatus Liberibacter asiaticus

Anaplasma phagocytophilum
Cowdria ruminantium
Ehrlichia chaffeensis
Ehrlichia equi
Orientia tsutsugamushi
Rickettsia conorii
Rickettsia felis

Rickettsia prowazekii
Rickettsia rickettsii
Rickettsia typhi

Francisella tularensis

Primer 354

Stenotrophomonas maltophilia

Xanthomonas malvacearum
Xanthomonas oryzae pv. oryzae
Xanthomonas oryzae pv. oryzicola
Xylella fastidiosa

Alteromonas tetraodonis

Actinobacillus actinomycetemcomitans

Haemophilus aphrophilus
Haemophilus aegyptius
Haemophilus ducreyi
Haemophilus influenzae
Haemophilus parahaemolyticus
Haemophilus parainfluenzae
Haemophilus paraphrophilus
Pasteurella multocida

Gamma

Tatlococcus micdadei
Legionella longbeachae
Legionella pneumophila
Coxiella burnetii

Aeromonas spp.
Aeromonas hydrophila

Vibrio cholerae
Vibrio parahaemolyticus
Vibrio vulnificus

Proteobacteria

Escherichia coli
Neisseria gonorrhoeae
Neisseria meningitidis

Beta

Achromobacter xylosoxidans
Bordetella pertussis
Burkholderia cepacia

Burkholderia mallei
Burkholderia pseudomallei
Ralstonia mannitolitica
Ralstonia pickettii
Ralstonia solanacearum

Acinetobacter baumannii
Acinetobacter calcoaceticus
Acinetobacter anitratus
Acinetobacter lwoffii
Acinetobacter radioresistans
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas alcaligenes
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas putida
Pseudomonas stutzeri
Pseudomonas syringae pv. glycinea

Mollicutes

Mycoplasma mycoides
Erysipelothrix rhusiopathiae
Mycoplasma pneumoniae

Firmicutes

Eubacterium sp.
Anaerococcus prevotii

Clostridium botulinum

Clostridium difficile
Clostridium perfringens

Clostridium septicum
Clostridium tetani
Peptococcus niger
Peptostreptococcus magnus
Veillonella dispar

Clostridia

Enterococcus faecalis
Enterococcus faecium
Enterococcus faecium

Staphylococcus aureus

Staphylococcus coagulase-negative
Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus haemolyticus

Primer 2249

Bacilli

Citrobacter freundii
Edwardsiella tarda
Enterobacter aerogenes
Enterobacter cloacae
Klebsiella pneumoniae

Moraxella catarrhalis
Morganella morganii
Plesiomonas shigelloides
Proteus mirabilis

Proteus vulgaris
Providencia sp.
Providencia stuartii

Pantoea agglomerans

Primers 358, 359

Escherichia coli

Klebsiella oxytoca

Salmonella choleraesuis
Salmonella enteritidis
Salmonella paratyphi
Salmonella typhi

Salmonella typhimurium
Serratia marcescens

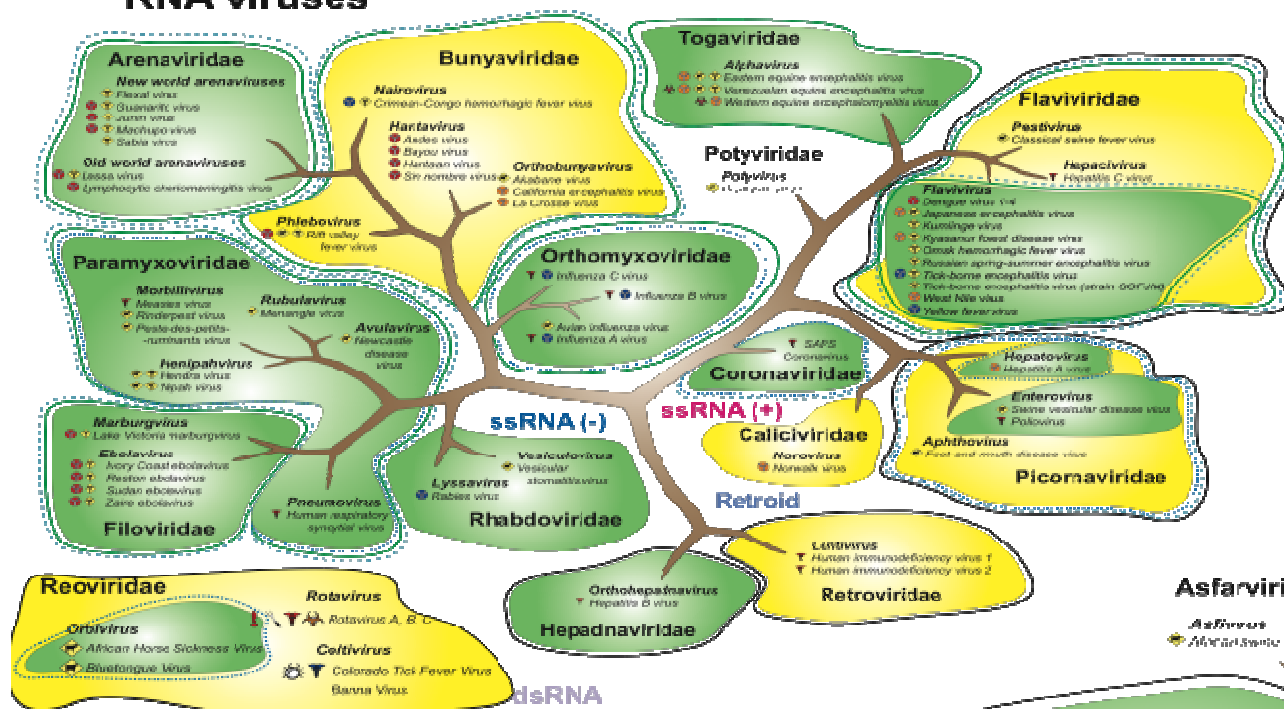
Shigella dysenteriae
Shigella flexneri

Shigella sonnei

Yersinia enterocolitica
Yersinia pseudotuberculosis
Yersinia pestis



RNA viruses



Primers validated and in use

Primer validation underway

Parvoviridae

Dependovirus
Adeno-associated virus 1-12, 2H, 3B

Parvovirus
Rheumatoid arthritis virus

Erythrovirus
B19 virus

ssDNA

DNA Viruses

dsDNA

Mastadenovirus
Human adenoviruses A-F

Adenoviridae

Poxviridae

Orthopoxvirus
Camelpox virus
Monkeypox virus
Variola virus

Capripoxvirus

Sheep pox virus
Lumpy skin disease virus
Grafting virus

Asfarviridae

Asfivirus
African Swine Fever virus

Herpesviridae

Simplexvirus
Cercopithecine herpesvirus 1
Human herpesvirus 1
Human herpesvirus 2

Rhadinovirus
Alcalaphine herpesvirus 1
Human herpesvirus 8

Cytomegalovirus
Human herpesvirus 5 (CMV)

Varicellovirus
Human herpesvirus 3 (chicken pox)

Roseolovirus
Human herpesvirus 6
Human herpesvirus 7

Lymphocryptovirus
Human herpesvirus 4

Papillomaviridae

Papillomavirus
Human papillomavirus

Polyomaviridae

Polyomavirus
BK polyomavirus
JC virus



Identificazione, virulenza, resistenza antibiotici

Resistenza
antibiotici (4-5 gg)



Identificazione Biochimica + Viremia
(3-4 gg)



Colture (1-3 gg)
+ Colorazione
Gram

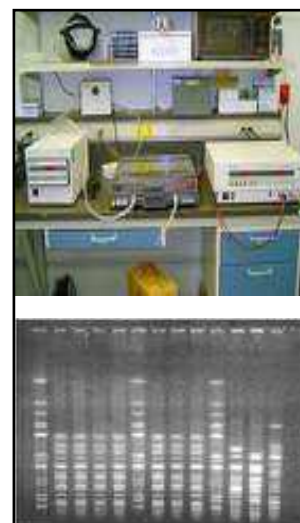


Raccolta Campione

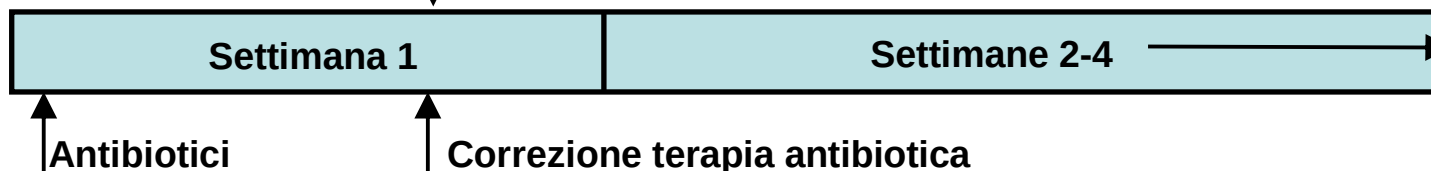


Tipizzazione, Identificazione

Pulsed-Field Gel
Electrophoresis



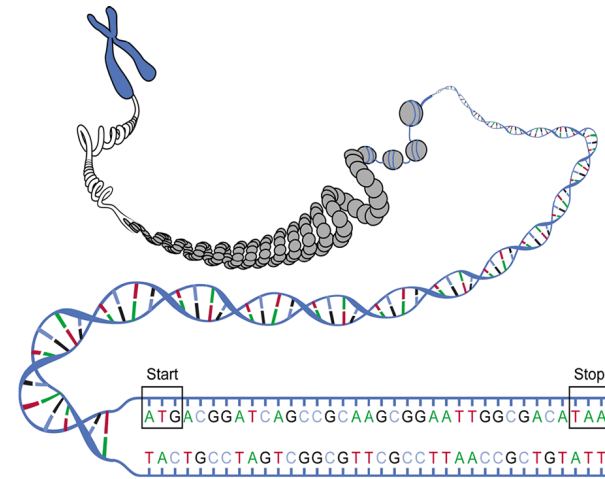
PCR + sequenza DNA





Biologia Molecolare

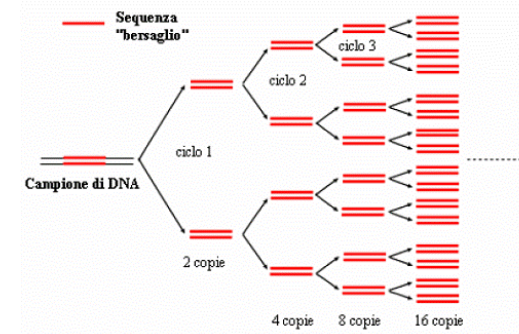
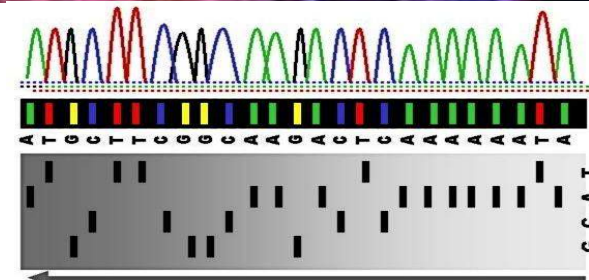
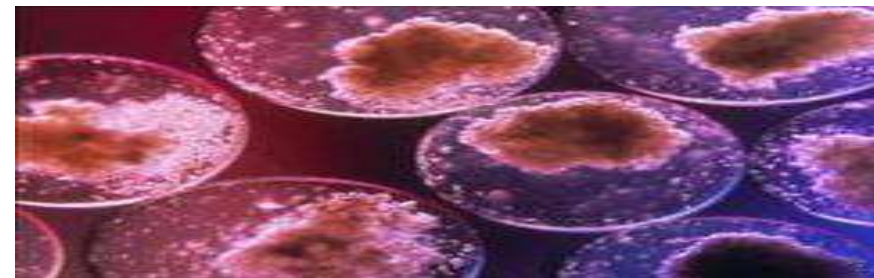
- Era nota solo in particolari laboratori di ricerca, ha fatto la sua comparsa nei laboratori clinici all'inizio degli anni 90.
- E' la disciplina che studia le molecole polimeriche negli organismi viventi e ne interpreta le loro interazioni.





Biologia Molecolare

- Si avvale di numerose tecniche e differenti tecnologie:
 - Clonazione
 - Plasmidi
 - Vettori
 - Sequenziamento
 - Analisi completa di tratti di DNA
 - Amplificazione genica
 - Ciclotermica
 - Isotermica



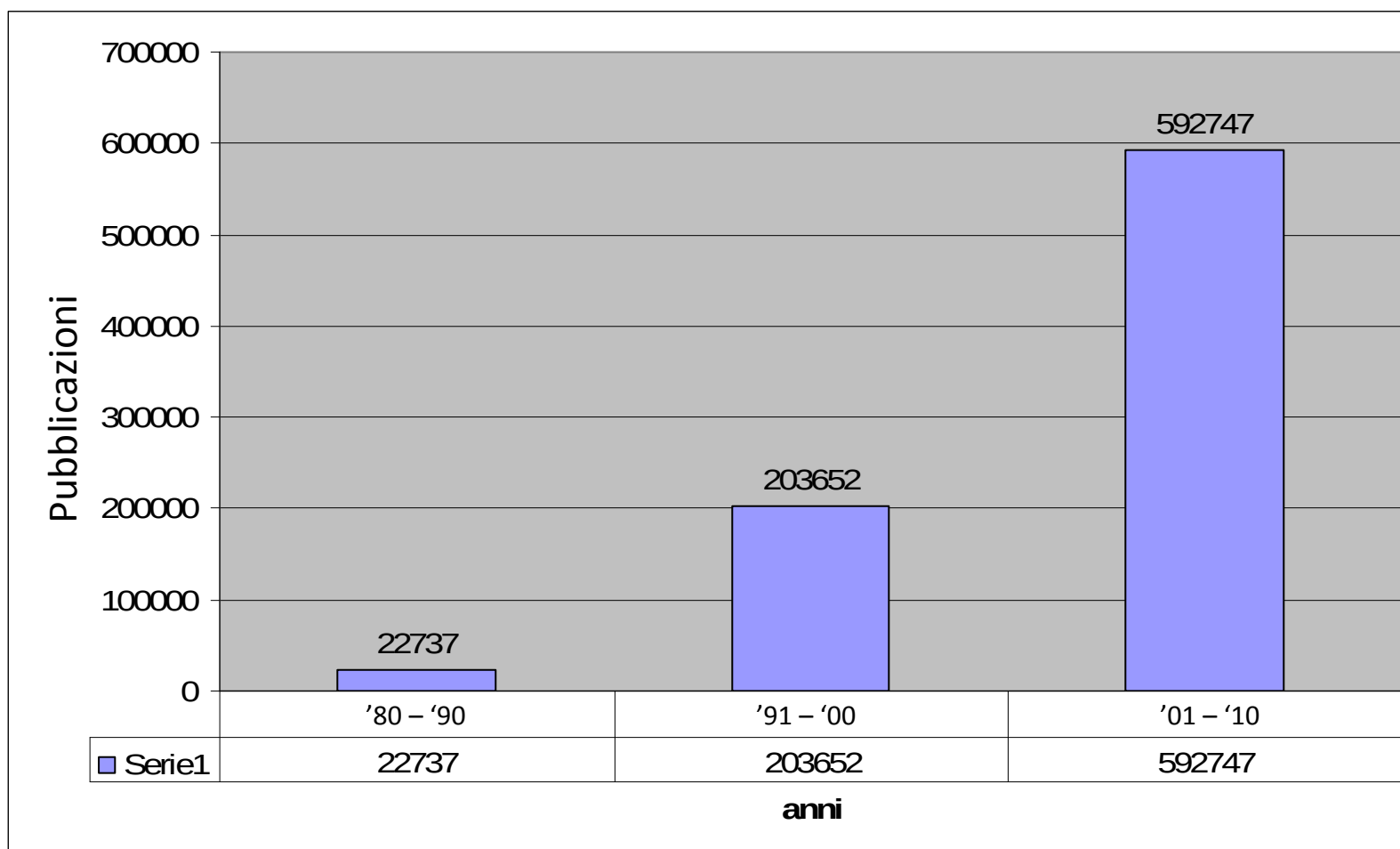


2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



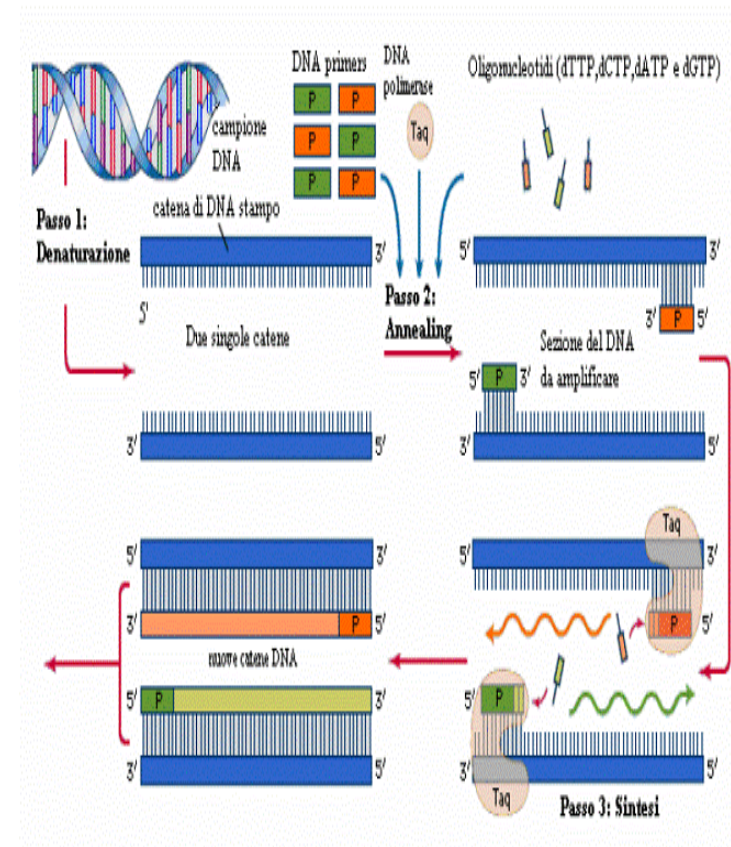
Fonte dati Pub Med 2012





Amplificazione Genica

- Elevata Specificità
 - Selezione di sequenze di innesco univoche per il target da analizzare
- Elevata Sensibilità
 - Amplificazione del target fino a 10^9 volte
- Rapidità esecutiva e di risposta
 - 3-4 ore da 1 a >100 campioni



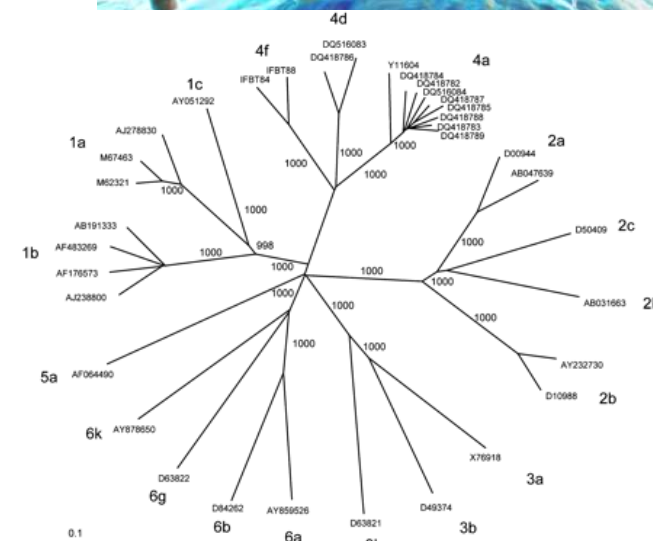
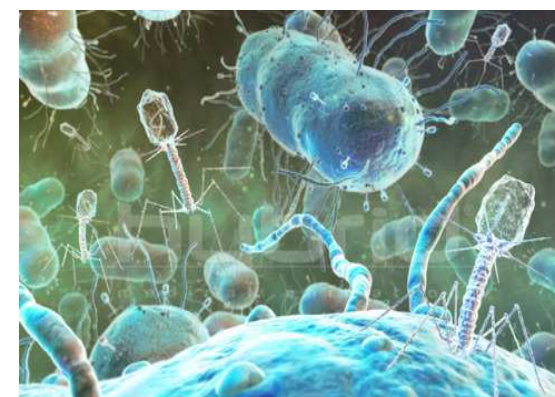
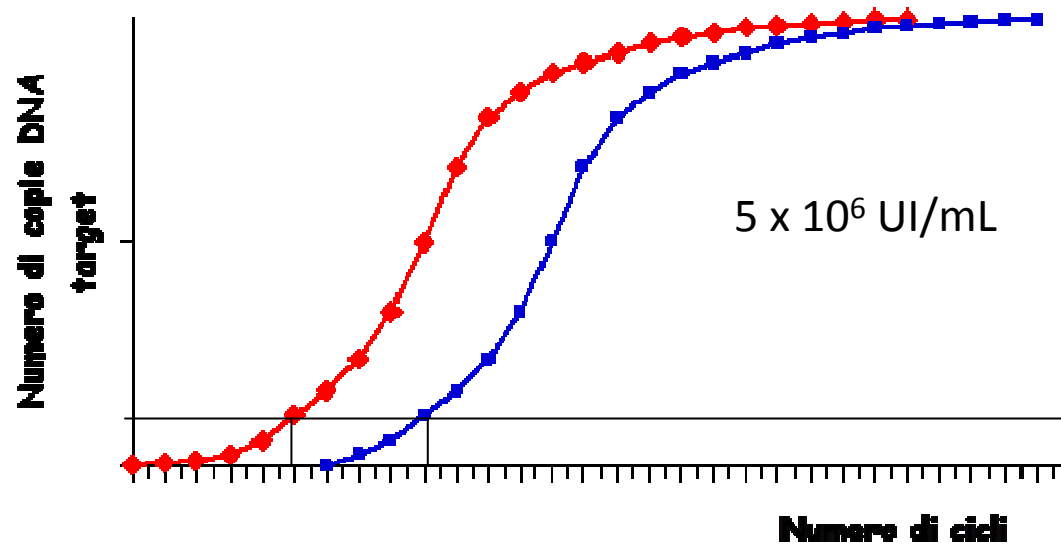


2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance

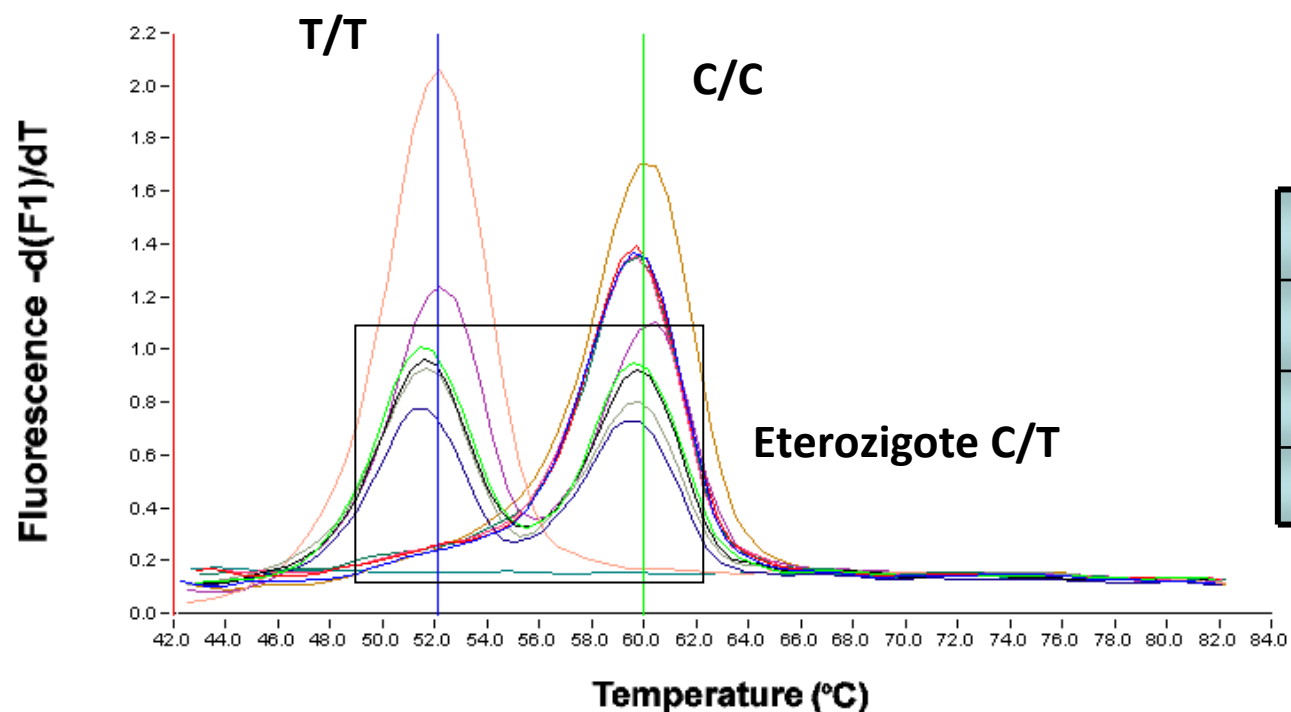


Analisi Quantitativa PCR-RT





Interleuchina 28-B

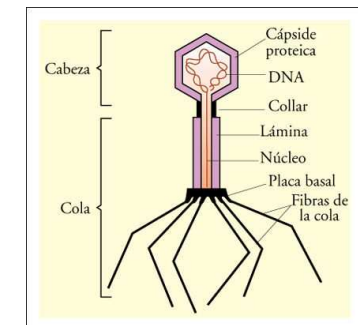
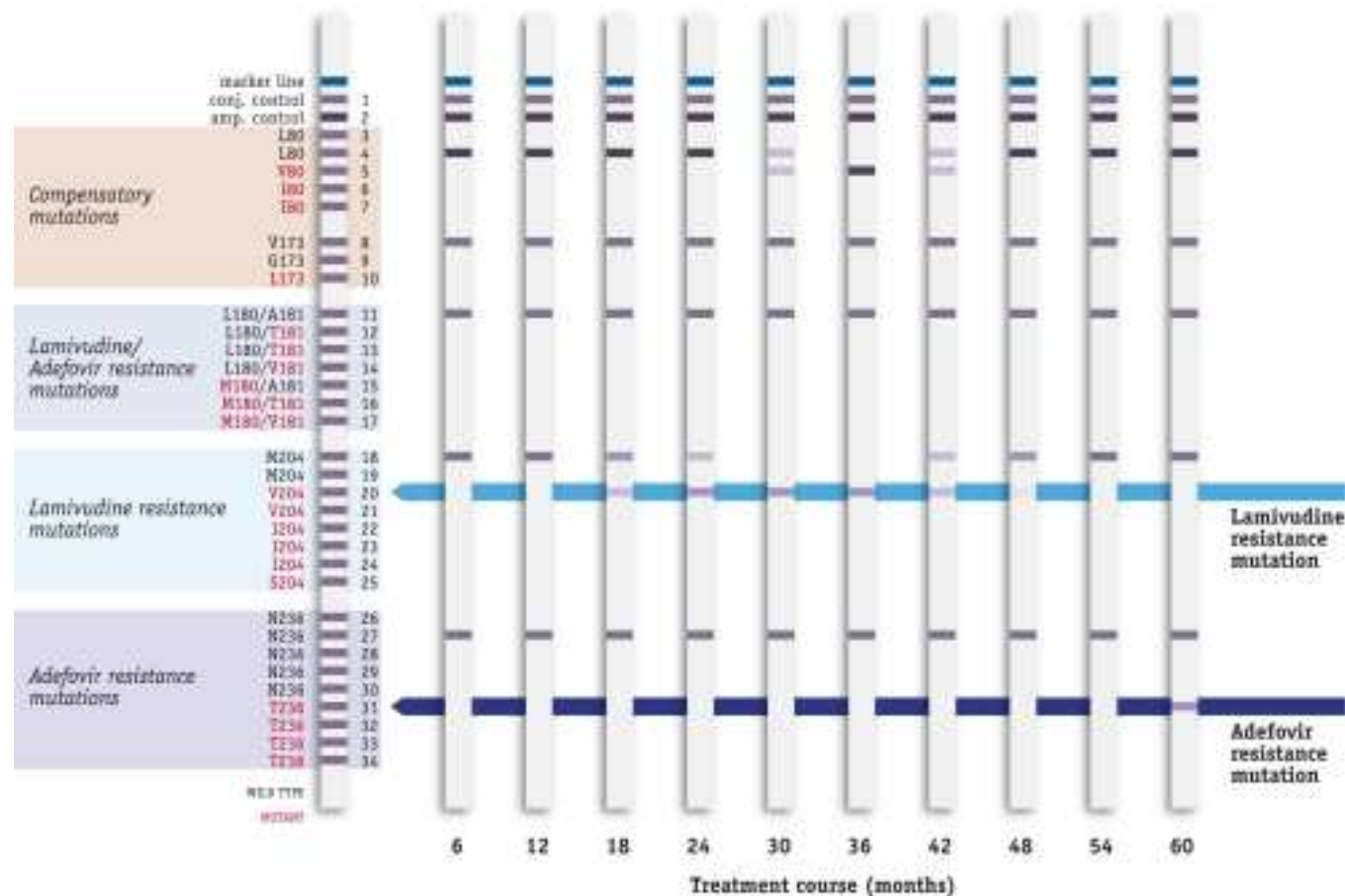


	C/C	T/T
I det	10^7 UI/mL	10^5 UI/mL
II det	0 UI/mL	10^2 UI/mL
III det	0 UI/mL	10^5 UI/mL

Polimorfismi in un singolo nucleotide del gene interleuchina 28B influenzano fortemente l'efficacia della terapia in pz HCV
Positivi G 1 – **rs12979860** -

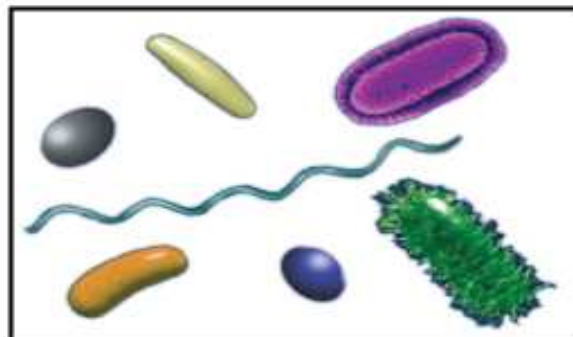


Farmaco resistenze

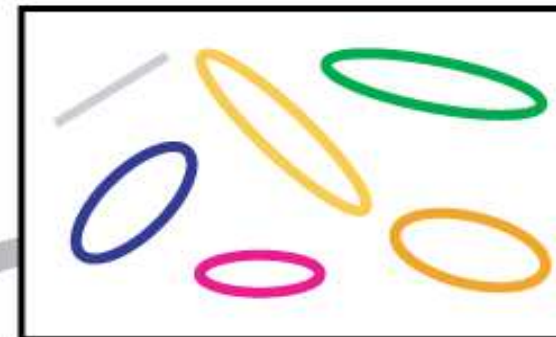




Microbe Mixture



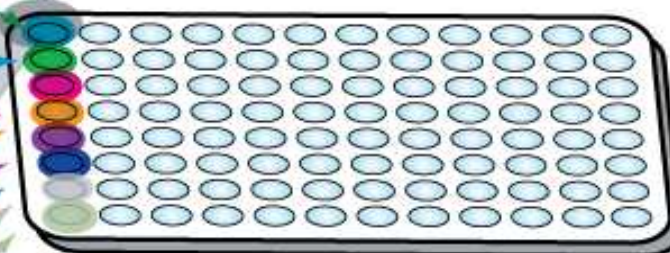
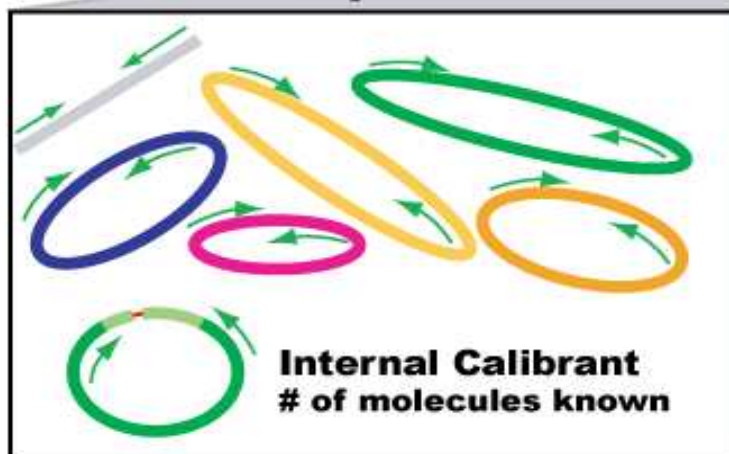
Extract Nucleic Acids



Broad Range Primers

- Primer pair 1
- Primer pair 2
- Primer pair 3
- Primer pair 4
- Primer pair 5
- Primer pair 6
- Primer pair 7
- Primer pair 8

PCR Amplification



PCR Products





2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



*Primers si legano a regioni
conservate presenti in tutti (o a
gruppi) batteri*

Target 16S & 23S rDNA

Primer pair

E. coli
Cox. burnetii
Leg. pneumophila
Ricket. prowazekii
Mycb. tuberculosis
Trep. pallidum
Bacillus anthracis
Staph. aureus
Staph. epidermidis
Strep. agalactiae
Strep. mutans
Strep. pneumoniae
Strep. pyogenes

GCATTAGATACCCGCTAGTCC

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

ACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCC-CTTGA-GGCGTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGAC
ACGCCGTCAACGATGAGAACTAGCTGTTGGGAAG--TTCA-CTTCTTAGTAGCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCTC
ACGCTGTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGTTAT-ATGAAATAAATTAGTGGCGCAGCAAAACGCGATAAGTTGAC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATATCGGAGG--ATTCT--CTTTCGGTTTCGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCCTTCTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCC
ACACAGTAAACGATGTACACTAGGTGTTGGGGC---ATGA--GTCTCGGCGCCGACGCAACGCATTAAGTGATC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGG-TTTCGCCCTTCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC

CGCCTGGGGAGTACGGCC

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

*Regioni variano in
differenti tipi di batteri =
informazioni*

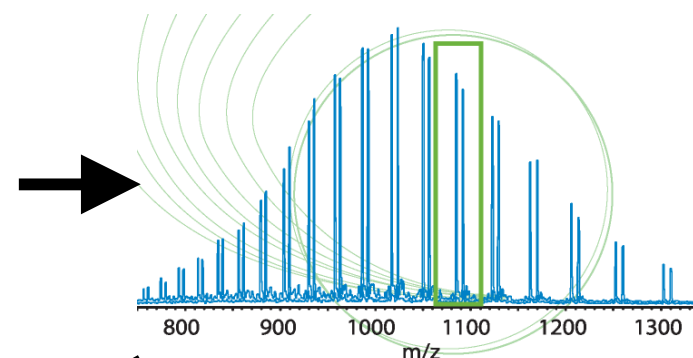
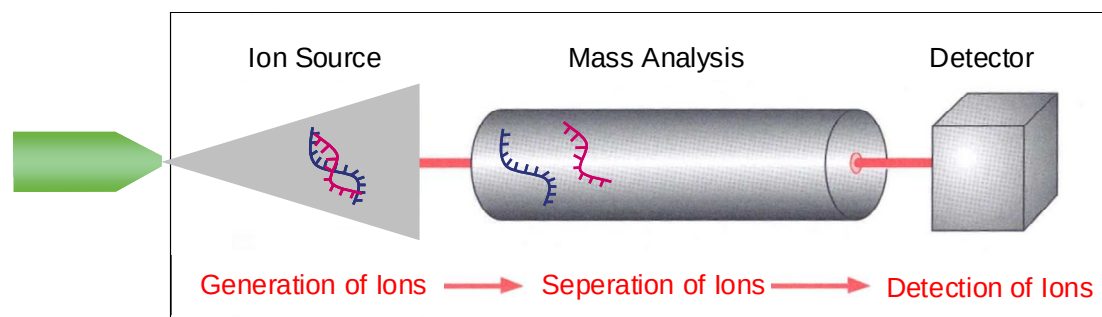


Gli ampliconi ottenuti producono una "Finger-Print" univoca per ciascun batterio



2° CONGRESSO NEWMICRO

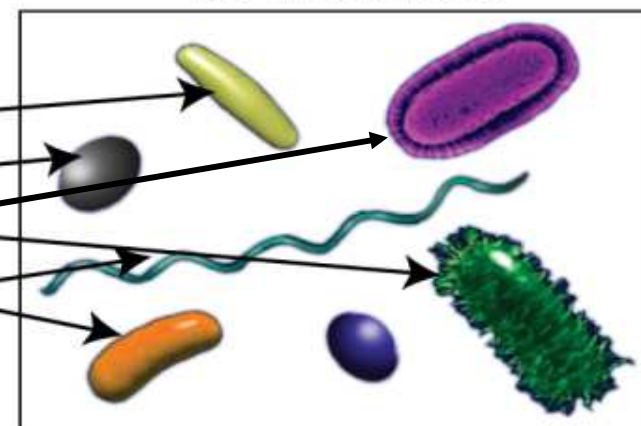
I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



Signal Processing Masses to Base Compositions

#	Mass	Base Count	Quantity
1	35875.03	A ₂₅ G ₃₅ C ₃₀ T ₂₆	4260
2	35297.70	A ₂₉ G ₃₃ C ₂₇ T ₂₅	1948
3	35619.87	A ₂₆ G ₃₆ C ₂₉ T ₂₄	1555
4	36196.21	A ₂₃ G ₃₇ C ₃₁ T ₂₆	1306
5	35297.70	A ₂₉ G ₃₃ C ₂₇ T ₂₆	1949

Base Compositions Map to Microbes







2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



- Genomica, Proteomica Transcrittomica, Interattomica: Biologia Molecolare.
- Tutto questo ha mutato definitivamente la concezione tradizionale del laboratorio di microbiologia clinica e il suo contributo all'assistenza sia in senso di cura dei pazienti che di prevenzione, specie delle patologie da infezione.



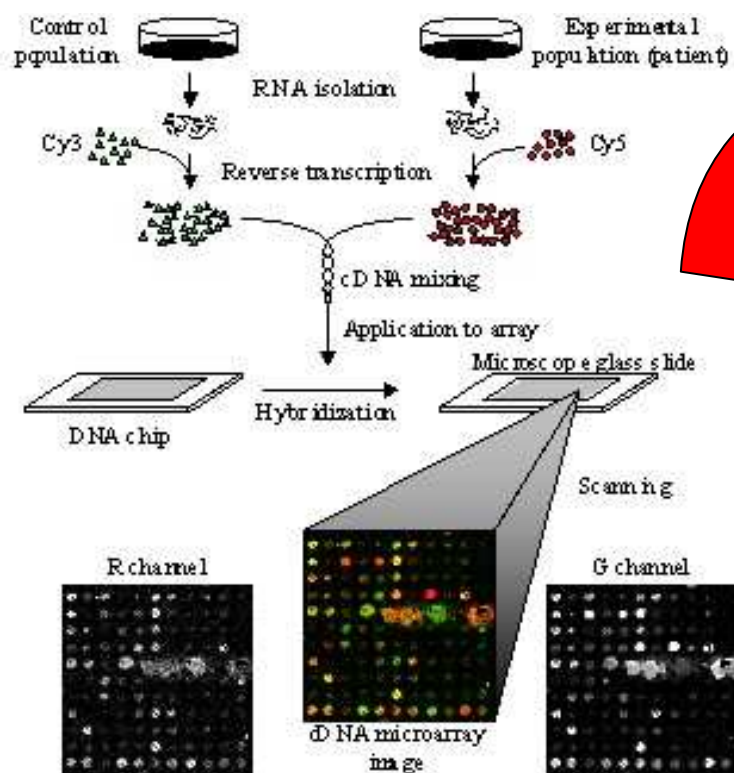
2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



Lati oscuri della Biologia Molecolare

- Attività non omogeneamente sviluppata in relazione ai bisogni clinici.
- Spesso dimensioni produttive che non raggiungono masse critiche accettabili: dispersione di risorse umane e strumentali.
- Difficoltà nel mantenere una rapida tempistica per contenere i costi.



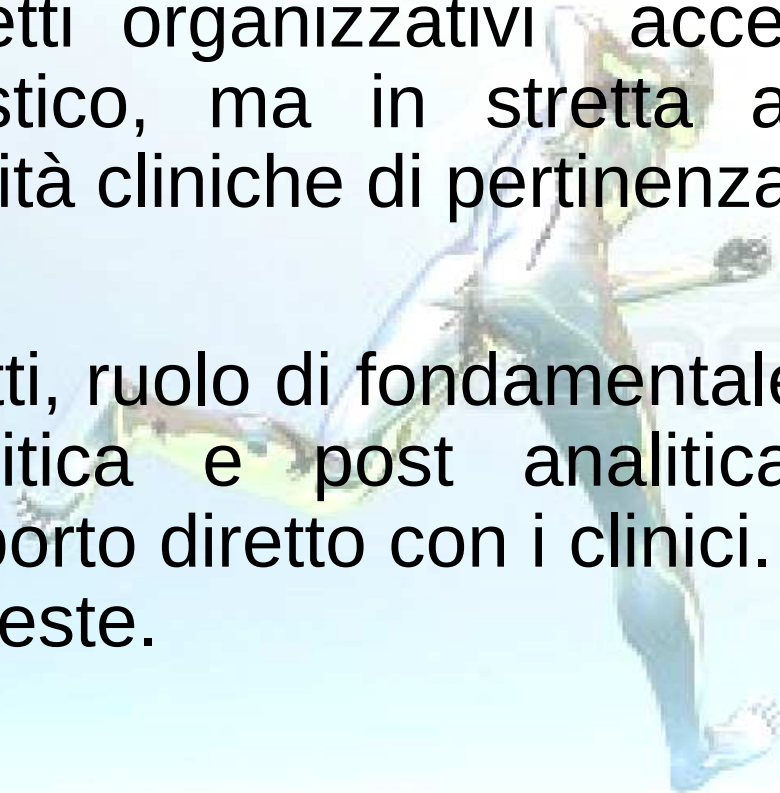


2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



- Di fronte agli elementi descritti sicuramente positivi, l'evoluzione sostenibile e razionale di questa attività specialistica si orienta verso assetti organizzativi accentrati, non con fine logistico, ma in stretta associazione con le attività cliniche di pertinenza.
- Infatti, ruolo di fondamentale rilievo è la fase pre-analitica e post analitica che prevede un rapporto diretto con i clinici. Appropriatezza delle richieste.





2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



- La opportuna razionalizzazione di questa specialistica consente di affrontare grosse numerosità e nel contempo garantire prestazioni in regime di urgenza.
- La diagnosi tempestiva, consente l'avvio immediato di terapie “personalizzate” che possono garantire al paziente *outcome* migliori.



2° CONGRESSO NEWMICRO

I laboratori di Microbiologia e la Clinical Governance



- L'adeguato dimensionamento della BM permette oltre all'ammortamento degli investimenti tecnologici anche di rispondere ai requisiti di qualità previsti dai processi di accreditamento e certificazione.
- Inoltre il corretto dimensionamento del numero e della complessità delle casistiche afferenti è condizione essenziale per garantire qualità ed efficacia.

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: Proposte

STACK:

```
(23)
/Title
()
/Subject
(D:20120423140523+02'00')
/ModDate
()
/Keywords
(PDFCreator Version 0.9.5)
/Creator
(D:20120423140523+02'00')
/CreationDate
(5317841)
/Author
-mark-
```