

## **Ricerca Corrente IZSVE 29/07 Sviluppo e applicazione di metodiche di Pyrosequencing® per l'identificazione e la genotipizzazione in ambito veterinario**

**Responsabile scientifico:** dott.ssa Paola De Benedictis

### **Abstract**

Pyrosequencing® è una tecnica di sequenziamento di corte sequenze di DNA che utilizza reazioni enzimatiche accoppiate e bioluminescenza per la rilevazione del segnale (Nyren, 2007). Al momento esso rappresenta il solo metodo di sequenziamento del DNA alternativo al Sanger. Pur avendo la limitazione del numero di basi sequenziabili (poche decine), offre notevoli vantaggi in termini di: elevato carico di lavoro, bassi tempi di analisi (a seconda del protocollo, da 17 min/96 campioni a un massimo di 100 minuti/96 campioni) e bassi costi analitici (circa 2-3 euro per campione). Le possibili applicazioni sono molteplici e vanno dalla identificazione di specie batteriche, fungine e virali alla rapida identificazione genetica di specie animali fino all'utilizzo di questa metodica per la genotipizzazione e la rilevazione di marcatori di resistenza o di patogenicità.

Il progetto si propone di sviluppare metodiche utilizzando tale tecnologia applicabile alla rilevazione rapida di mutazioni genetiche in patogeni virali aviari aventi un impatto sull'economia avicola e/o sulla sanità pubblica.

Precedenti esperienze (Deyde et al., 2007; Pourmand et al., 2006) hanno dimostrato il valido utilizzo di questa tecnologia nello studio delle resistenze agli antivirali dei virus influenzali dell'uomo e nella rapida determinazione del patotipo riguardante il virus influenzale aviare H5N1.

Nel progetto verranno ampliate le applicazioni del Pyrosequencing® nello studio dei virus influenzali aviari, con particolare attenzione allo studio dei geni HA e PB2. Verranno inoltre sviluppate applicazioni utilizzabili per lo studio di altri patogeni virali emergenti dal serbatoio aviare. Gli agenti virali oggetto dello studio saranno selezionati sulla base di uno o più dei seguenti parametri:

- presenza di molteplici e distinte linee genetiche del virus

- presenza di differenti patotipi del virus
- presenza di marcatori genetici responsabili di variazione della virulenza, organotropismo o della specificità di ospite
- impatto sulla industria avicola
- impatto sulla salute pubblica (es. agenti zoonosici virali).

Il progetto si avvarrà inoltre dell'ausilio d'infezioni sperimentali al fine di verificare la corrispondenza tra genotipo riscontrato e fenotipo osservato, e quindi di determinare marcatori molecolari di virulenza, ospite-specificità e tessuto-tropismo.