

XXXIV CICLO - Anno Accademico 2020/2021

Dottorando: Dott. Andrea Divizia

Tutor: Prof. Leonardo Palombi

Titolo tesi: Laser-Induced Fluorescence e Silicon Nanowires: tecniche moderne di analisi virologica

ABSTRACT

Background – La diffusione degli agenti biologici quali batteri, funghi e virus, rappresenta un rischio per la salute umana, in quanto in condizioni di alterato equilibrio tra la suscettibilità dell'ospite e la patogenicità dell'agente, possono portare all'insorgenza delle malattie infettive.

La diagnosi delle malattie infettive richiede l'esecuzione di un accurato esame clinico, la valutazione dei dati epidemiologici e la formulazione di un'ipotesi diagnostica che suggerisca il possibile agente eziologico. La diagnosi specifica viene successivamente stabilita dall'applicazione di metodi appropriati, la cui scelta dipende dall'organismo sospettato.

Nonostante il progresso degli approcci molecolari, l'identificazione di agenti quali batteri e funghi sfrutta ancora metodi tradizionali, come il microscopio ottico. Nella ricerca dei virus, invece, il microscopio ottico consente di visualizzare solo gli aggregati di particelle virali all'interno delle cellule (inclusione virale), senza peraltro poterle distinguere l'una dall'altra. Per questo, l'analisi dei virus richiede l'utilizzo di strumenti differenti, quali i microscopi elettronici.

Al momento, il metodo diagnostico più comune è la crescita e coltivazione di microrganismi in vitro, necessario anche per la valutazione della suscettibilità microbica, che però richiede tempi lunghi, da pochi giorni a qualche settimana.

L'analisi virologica, in particolare, è complicata da una serie di fattori. Innanzitutto, la linea cellulare più idonea per la crescita e l'isolamento dei virus dipende dal tropismo del virus stesso, pertanto non esiste un'unica linea cellulare utilizzabile per tutti i virus. Inoltre, alcuni virus non si moltiplicano affatto sulle linee cellulari. D'altra parte, le reazioni sulle quali si basano i metodi molecolari anche più recenti possono subire delle interferenze per la presenza di altri componenti nei campioni analizzati. Per superare

quest'ostacolo è necessario l'uso di primers specifici ed il conseguente sequenziamento di regioni amplificate.

Sia i metodi tradizionali che molecolari richiedono tempi di esecuzione molto lunghi che possono causare un impatto significativo sulla sicurezza della popolazione, aumentando il rischio di diffusione delle patologie infettive.

Materiali e metodi – Il primo studio ha utilizzato un fascio laser a determinata lunghezza d'onda, facendolo passare attraverso dei fori in una scatola chiusa, contenente i campioni da analizzare (campione di controllo con terreno puro, campioni di virus isolati e campione con miscela di virus), per valutare la fluorescenza emessa dal campione, raccolta da uno spettrometro. Nel secondo studio è stata valutata la possibilità di utilizzare i nanofili di silicio come vettori per trasportare i virus all'interno di colture cellulari, favorendo la moltiplicazione del virus stesso. Il terzo studio ha confermato i risultati ottenuti sulla fluorescenza indotta da laser, cercando di ottimizzare la tecnica. In una seconda fase, non ancora conclusa, la tecnica così ottimizzata dovrà essere applicata alla pratica clinica per la ricerca del SARS-CoV-2 in campioni di saliva.

Risultati – Il primo studio ha dimostrato, per la prima volta, l'applicabilità della fluorescenza indotta da laser nella ricerca di virus isolati e di miscele virali. Questa tecnica non solo si è dimostrata in grado di identificare la presenza dei virus, ma anche di poterli classificare e quantificare in base all'intensità dello spettro della luce riflessa. Il secondo studio, ha dimostrato come i nanofili di silicio possano essere utilizzati come vettori dei virus all'interno delle cellule, poiché non solo vengono rinvenuti all'interno del citoplasma delle cellule analizzate, ma non presentano neanche alcun tipo di tossicità cellulare. Il terzo studio ha confermato i dati ottenuti sulla fluorescenza indotta da laser ed ha analizzato la variabilità interindividuale di campioni salivari, ottimizzando la tecnica per le applicazioni nella pratica clinica.

Conclusioni – I risultati di questo dottorato di ricerca aprono la strada verso nuove tecniche di analisi virologica che, una volta ottimizzate e applicate nella pratica clinica, consentiranno un migliore controllo della diffusione delle malattie infettive, con impatto positivo sulla salute pubblica e sulla spesa sanitaria.

Parole chiave – Analisi virologica; Fluorescenza indotta da laser (LIF); Nanofili di silicio (SiNWs); malattie infettive; SARS-CoV-2