

THE HEALTH LA SALUTE

LA SALUTE
È UNO STATO
DI COMPLETO
BENESSERE
FISICO, MENTALE
E SOCIALE,
E NON CONSISTE
SOLTANTO
IN UN'ASSENZA
DI MALATTIA
O DI INFERMITÀ.

ORGANIZZAZIONE MONDIALE SANITÀ

EDITORE: IMM.RE S. CARLO, MILANO, VIA VARESE 20, TEL. 02/94967163 - GRAFICA E COMPOSIZIONE: ADVERTIME, NOVARA - STAMPA: TIPOLITOGRAFIA ITALGRAFICA, NOVARA.

IN QUESTO NUMERO

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DELLA SARS E DELLE POLMONITI ATIPICHE	1	TROMBOFILIA EREDITARIA	14
PCR REAL-TIME E CARICA VIRALE HCV	4	RICERCA DELLE MICROMETASTASI LINFONODALI NEL CARCINOMA POLMONARE MEDIANTE VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELL'RNA MESSAGGERO DEL CEA	17
IL SEQUENZIAMENTO NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGIA CLINICA	7	LA TECNOLOGIA DEI DNA MICROARRAYS	20
DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN PARASSITOLOGIA	10	PREANALITICA DEGLI ESAMI CLINICI DI BIOLOGIA MOLECOLARE	22

DIAGNOSTICA MOLECOLARE DELLA SARS E DELLE POLMONITI ATIPICHE

C.Balotta¹, S.Corvasce¹, M.Gramegna³, R.Tagliabue³, M.Violin¹, B.Argentero², G.M.Vigevani², M.Galli¹, M.Moroni¹.

1. Istituto di Malattie Infettive e Tropicali – Università di Milano

2. 1a Divisione di Malattie Infettive – Ospedale "L. Sacco", Milano 3. Laboratorio Ricerca e Sviluppo – Clonit srl, Milano

Differential molecular detection of SARS CoV and respiratory illness

The diagnostic field was recently revolutionized by the Molecular Biology, and, in particular, by a technique called Polymerase Chain Reaction (PCR).

Severe acute respiratory syndrome is a respiratory illness caused by a novel coronavirus, called SARS-associated coronavirus (SARS-CoV) that troubled the world in the past months.

Three types of specimens may be collected for viral or bacterial isolation and PCR. These include: 1) nasopharyngeal wash/aspirates; 2) nasopharyngeal

swabs or 3) oropharyngeal swabs.

A novel kit was developed in Clonit for the molecular detection of the SARS CoV, the SARS NAT Test System for amplification and detection of the SARS Coronavirus genome. The test includes ready-to-use, standardized reagents.

The amplification product, obtained from a double amplification using the nested method, is a 109 bp fragment and it is detected by electrophoresis on pre-cast gels containing ethidium bromide (0,5 mg/ml). A gel electrophoresis detection reveals the presence, or absence, of the specific band corresponding to a 109 bp fragment of the Coronavirus responsible for SARS.

La biologia molecolare, ed in particolare la Polymerase Chain Reaction, sempre più rivela la sua utilità ed importanza non soltanto nel mondo della ricerca, ma anche in quello della diagnostica clinica.

Le applicazioni di queste recenti metodiche spaziano ormai dagli ambiti classici della virologia e della microbiologia a quelli della genetica, della veterinaria e dell'alimentazione.

Un nuovo settore di applicazione, con l'esplosione del caso Antrace, ha riguardato la sicurezza ed il bioterrorismo. Infine, ultimo ambito di applicazione, ma probabilmente uno dei più importanti per quanto



FLEMING

RESEARCH S.R.L.

ANALISI CLINICHE

ABBIATEGRASSO (MI) Via S. Carlo, 30

Direttore Responsabile Dr. Alberto STANGALINI – Spec. Microbiologia

Autorizzazione Regionale DR 964/SAN.81

Autorizzazione Pubblicità N.31873/93

Telefono: 02.94967163

FAX: 02.94960386

e-mail: info@fleming-research.it

sito internet: www.fleming-research.it

- ▶ **LABORATORIO GENERALE DI BASE**
SEZIONI Specialistiche
- ▶ **ANATOMIA PATOLOGICA**
- ▶ **BIOCHIMICA E TOSSICOLOGIA**
- ▶ **CITOGENETICA E GENETICA MEDICA**
- ▶ **EMATOLOGIA ed EMOCOAGULAZIONE**
- ▶ **MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA**

SERVICE DI LABORATORIO

- Ritiro giornaliero Campioni Biologici con Corriere Espresso pre-pagato
- Elenco Esami e Listini disponibili sul Sito Internet
- Laboratorio Centralizzato per Sperimentazioni Cliniche (Fase 4)

riguarda la sicurezza sociale, ha riguardato il mondo intero con l'insorgere della problematica inerente il contagio della SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome).

La SARS è una malattia respiratoria virale che è stata segnalata per la prima volta in Asia nel febbraio 2003. Ai primi di marzo la WHO (World Health Organization) ha lanciato un allarme generale riguardante la diffusione della SARS.

Negli ultimi mesi l'infezione si è allargata a più di due dozzine di stati nel Nord America, Sud America, Europa ed Asia.

Dalla fine di giugno nessun nuovo caso è stato segnalato e l'infezione è considerata attualmente sotto controllo.

I dati forniti dal WHO dicono che 8.098 persone si sono ammalate di SARS durante il periodo dell'infezione, delle quali 774 sono morte.

La malattia solitamente si manifesta con febbre alta (superiore a 38°C) associata a brividi e, spesso, mal di testa oltre a malessere generalizzato. In alcuni casi compaiono subito difficoltà respiratorie.

Dopo 2-7 giorni, i pazienti affetti da SARS possono sviluppare tosse secca accompagnata da ipossia, in progressivo peggioramento.

Il 10-20 % dei pazienti necessita di respirazione meccanica e, spesso, si manifesta polmonite.

La causa della SARS è un Coronavirus, mai identificato in precedenza, chiamato SARS-Associated Coronavirus (SARS-CoV). La via primaria di contagio è determinata dal contatto diretto tra persone. Si pensa che il virus possa trasmettersi attraverso le microgocce che un portatore produce starnutando o soffiandosi il naso. Inoltre può dar inizio al contagio il contatto con oggetti o materiali contaminati ed il successivo contatto con la bocca o le mucose nasali. Infine è possibile che il CoV possa trasmettersi attraverso l'aria o mediante modalità al momento sconosciute.

I Coronavirus sono un gruppo di virus che presentano un alone o una sorta di corona quando osservati al microscopio elettro-

nico. Tali virus sono la causa comune di malattie lievi dell'apparato respiratorio superiore negli uomini e sono associati a malattie respiratorie, gastrointestinali, epatiche e neurologiche negli animali. Non ci sono ancora sufficienti informazioni per spiegare la gravità della malattia causata dal nuovo virus. I Coronavirus sono stati evidenziati occasionalmente in associazione a



polmoniti nell'uomo specialmente in pazienti immunocompromessi.

In Italia sono stati segnalati solo pochi casi sospetti di SARS. Tra questi un solo paziente è risultato positivo e un ceppo CoV del gruppo 4 è stato identificato ed isolato all'Ospedale Sacco di Milano, uno dei due centri di riferimento nazionali.

I campioni sospetti sono stati analizzati mediante PCR utilizzando un sistema in nested messo a punto nei laboratori dello stesso Ospedale Sacco ed un kit commerciale (Clonit Srl, via Quaranta 57 - Milano - SARS NAT TEST cod. AMS91).

Un uomo di 36 anni (A.S.) che era stato in Hanoi (Viet Nam) per lavoro è il paziente poi risultato positivo. Un campione di saliva prelevato da A.S. nella fase acuta della

malattia è stato diluito in PBS, aliquotato e conservato a -80°C.

Un'aliquota di 0,5 ml è stata estratta per ottenere l'RNA virale con un kit commerciale (QIAamp Viral RNA Mini kit, Qiagen). Per l'amplificazione sono stati impiegati i primers di riferimento pubblicati dal CDC di Atlanta (esterni BNIoutS2 e BNIoutAs, interni BNIinS e BNIinAS) che identificano rispettivamente un frammento di 189 paia di basi (bp) ed uno di 109 bp.

Il kit della Clonit prevede un unico passaggio per la retrotrascrizione e la prima amplificazione grazie ad un sistema brevettato che sfrutta termopolimeri attivati a temperatura controllata.

La presenza del SARS-CoV è stata rivelata sia dal sistema sviluppato dall'Ospedale Sacco sia dal kit commerciale della Clonit. La specificità dei frammenti amplificati è stata confermata mediante sequenziamento. La recente infezione di SARS, che ha avuto un importante impatto sia per la sanità a livello mondiale sia per l'economia con la chiusura di alcune frontiere e le pesanti limitazioni nei trasferimenti aerei e tra paesi, lascia supporre un nuovo possibile allarme nei prossimi mesi invernali. L'autunno tipicamente vede l'insorgere di numerose patologie respiratorie che possono manifestarsi come banali raffreddori fino a patologie più importanti e pericolose quali le polmoniti atipiche.

Strettamente correlate alle problematiche inerenti la SARS sono quindi altre patologie respiratorie, tutte identificabili in biologia molecolare, tra le quali Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila, Citomegalovirus.

In conclusione, la biologia molecolare è di importanza critica per sostenere la diagnosi differenziale delle malattie respiratorie, di SARS-CoV nei casi sospetti, nello studio delle caratteristiche dei nuovi Coronavirus e nel controllo delle epidemie.

La sequenza dei vari ceppi del virus potrà consentire di rintracciare la fonte dell'infezione e realizzare in tempi brevi un vaccino efficace.

PCR REAL-TIME E CARICA VIRALE HCV: Standardizzazione di una metodica quantitativa con lo Standard Internazionale WHO

Massimiliano Valisi e Maurizio Gramegna - Clonit srl
Davide Stangalini e Marzia Della Morte - Fleming Research srl

REAL-TIME PCR and HCV VIRAL LOAD

The use of the polymerase chain reaction (PCR) in molecular diagnostics has increased to the point where it is now accepted as the gold standard for detecting nucleic acids from a number of origins and it has become an essential tool in the research laboratory. Real-time PCR has engendered wider acceptance of the PCR due to its improved rapidity, sensitivity, reproducibility and the reduced risk of carry-over contamination.

There are currently five main chemistries used for the detection of amplification product during real-time PCR, the most diffused is the TaqMan®, with this chemistry,

a fluorogenic probe complementary to the target sequence is added to the PCR reaction mixture. The probe consists of an oligonucleotide with a reporter and quencher dye attached. During PCR, if the target of interest is present, the probe anneals specifically between the forward and reverse primer sites. The nucleolytic activity of the polymerase cleaves the probe, which results in an increase in the fluorescence intensity of the reporter dye. This process occurs in every cycle and does not interfere with the accumulation of PCR product.

Real-time PCR offers significant improvements to the quantitation of HCV viral load because of its enormous dynamic range that can accommodate at least eight log₁₀ copies of nucleic acid template and is also an attractive alternative to conventional

PCR for the study of HCV viral load because of its low inter-assay and intra-assay variability and its equivalent or greater analytical sensitivity in comparison with traditional viral culture, or conventional single-round, and nested PCR.

A limitation for all current HCV RNA quantitation assay is that it is impossible to compare assay performance and to determine which assays are most accurate and sensitive. This limitation can be overcome by adopting a commonly accepted standard of measurement, the international unit (IU). In order to standardize the HCV viral load assay used in Fleming-research lab, we calibrated the Real-Time PCR CLONIT Standard against the world Health Organisation (WHO) First International Standard for HCV RNA.

PCR Real-Time Quantitativa

L'utilizzo delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici o **NAT (Nucleic acid Amplification Technology)** in diagnostica molecolare è ormai considerato universalmente il "gold standard" per quanto riguarda l'identificazione di target genomici in campioni biologici con elevatissima sensibilità e specificità ed è divenuto uno strumento essenziale per tutti i laboratori di analisi. Recentemente, con lo scopo di migliorare l'analisi quantitativa e ridurre la laboriosità delle analisi dell'amplificato (elettroforesi, ELISA, etc.), si sta assistendo

ad una sempre maggior diffusione di una particolare metodica NAT, la **PCR Real-Time Quantitativa**.

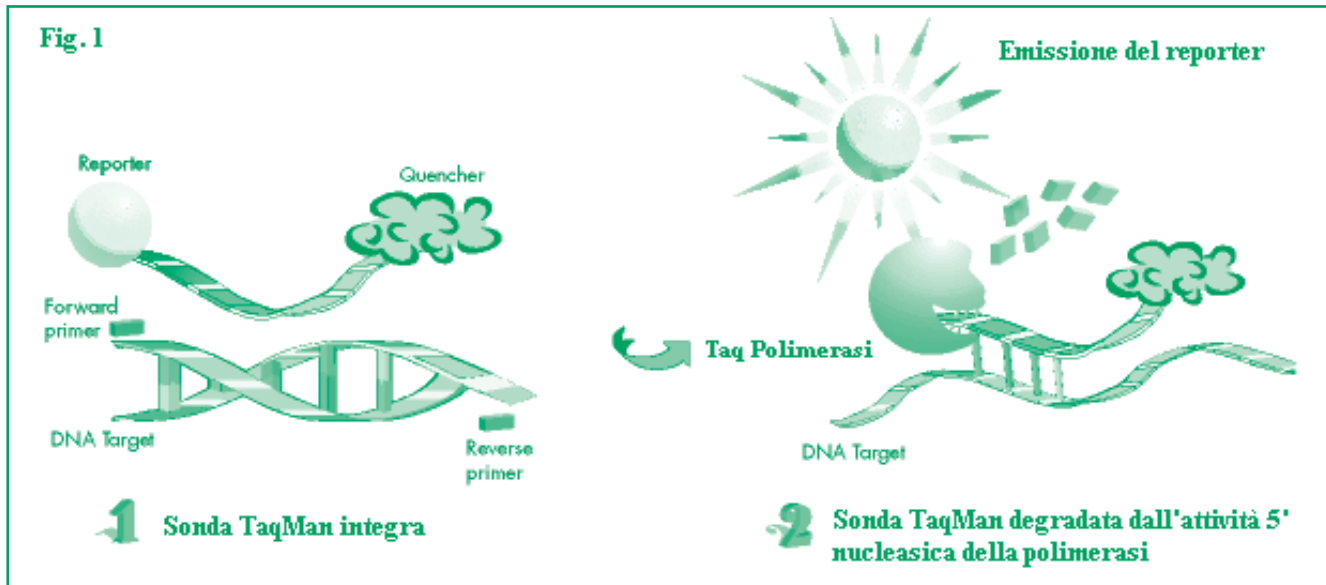
Con la PCR Real-Time non sono richieste manipolazioni post amplificazione e questo comporta l'eliminazione dei problemi di carry-over, la diminuzione dei tempi di ottenimento dei risultati e introduce la possibilità di monitorare costantemente, in "tempo reale", l'andamento della reazione.

La possibilità di visualizzare l'accumulo del prodotto di amplificazione in "real time" è reso possibile dalla marcatura di primers, sonde o ampliconi con molecole fluorescenti.

Sono state messe a punto differenti chimiche che consentono di rilevare in modo specifico gli ampliconi e per quanto riguarda il lavoro da noi svolto si è utilizzato un saggio real-time basato sulla chimica più diffusa nei laboratori analisi, la **TaqMan®**.

Il saggio in questione si basa sulla presenza nella tradizionale miscela di reazione della PCR di un oligonucleotide sonda non estendibile, che ibrida specificatamente una regione del DNA bersaglio compresa tra le due sequenze degli oligonucleotidi primer. La sonda è marcata con due molecole fluorescenti: il **reporter**, una fluoresceina modificata posta all'estremità 5' e il **quen-**

Fig. 1



cer, una rodamina modificata posta all'estremità 3', la cui fluorescenza è l'unica efficientemente misurabile quando la sonda è integra; durante la PCR, ad ogni ciclo di amplificazione l'enzima Taq polimerasi non solo duplica il bersaglio, ma, con la sua **attività 5' nucleasica**, degrada anche la sonda ad esso ibridata separando i due fluorocromi e rendendo così pienamente rilevabile l'emissione del reporter.

Dato che una coppia di DNA duplicata durante la PCR è accompagnata dalla liberazione di una molecola di reporter, la fluorescenza relativa che si accumula nel campione è in ogni momento proporzionale alla quantità di DNA amplificato. Tale tecnica è stata condotta sullo strumento ABI PRISM 7000 (Applied) in grado di funzionare contemporaneamente sia da termociclatore sia da fluorimetro. Il programma deputato a gestire lo strumento, Sequence Detection System (SDS), acquisisce lo spettro di emissione del campione per tutta la durata della reazione di PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione in tempo reale della cinetica di amplificazione. Il ciclo di PCR in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter dovuto non a mera variazione del "rumore di fondo" del sistema ma a specifico evento di amplificazione è definito **ciclo soglia (Ct)** della reazione. Il saggio Taqman quantifica il DNA bersaglio al ciclo soglia quindi, quando la reazione di PCR è in fase

esponenziale, condizione essenziale per eseguire una corretta quantizzazione.

Determinazione della carica virale di HCV.

La quantificazione degli acidi nucleici è estremamente importante per stabilire il grado di attività di un'infezione, per monitorare l'evoluzione della malattia, per differenziare un'infezione attiva da una persistente e per definire quale sia il ruolo della riattivazione virale o della progressione della malattia, per studiare le interazioni virus-ospite e soprattutto per impostare la terapia antivirale nonché per monitorarne la risposta (1,2).

Per quanto riguarda l'epatite C, la determinazione di HCV-RNA plasmatico è di fondamentale importanza nella valutazione del paziente candidato al trattamento con interferone. Infatti il basso livello di HCV-RNA iniziale è considerato, assieme al genotipo diverso dall'1 e all'assenza di cirrosi, uno dei fattori maggiormente correlati ad una risposta "sustained" alla terapia. Per questa ragione la determinazione della viremia acquista un importante significato nella decisione se attuare o meno il trattamento del paziente.

La determinazione quantitativa di HCV-RNA ha un significato anche nel monitoraggio della terapia, dato che la scomparsa dell'HCV-RNA è ritenuta, assieme alla nor-

malizzazione delle ALT, uno degli obiettivi della terapia. In particolare i pazienti che, pur avendo una normalizzazione delle ALT restano positivi per HCV-RNA, sono anche quelli che più frequentemente hanno poi una ripresa dell'attività virale alla fine del trattamento. L'introduzione delle metodiche quantitative Real-Time, con sensibilità analoga a quelle dei metodi qualitativi attuali, ha reso possibile eseguire la determinazione della risposta virologica al termine della terapia con l'utilizzo di un solo test, senza dover più ricorrere alle tecniche di PCR qualitativa.

Un'altra applicazione del dato quantitativo riguarda la trasmissione verticale delle infezioni da HCV, dove si ha evidenza che solo madri con titoli alti o contemporanea infezione da HIV-1 possano trasmettere il virus dell'epatite C ai figli.

Oltre a questi vi sono molti aspetti dell'infezione da HCV che devono essere chiariti e per i quali il dato quantitativo, associato a dati ottenuti con altre tecniche molecolari come il sequenziamento, potrebbe essere fondamentale (3,4,5).

Necessità di standardizzazione e gli standard WHO

La sensibilità e la specificità dei test basati su tecnologia NAT, possono variare da laboratorio a laboratorio, rendendo difficile una comparazione dei dati prove-

nienti da laboratori diversi. Pertanto l'introduzione in routine di un metodica NAT dovrebbe essere preceduta da un passaggio chiave: **la standardizzazione della metodica**, ossia accertarsi che la procedura adottata sia adeguata in termini di sensibilità, specificità e robustezza. Inoltre, il contenuto di acido nucleico viene espresso a seconda della metodica in uso in modi diversi, utilizzando unità di misura differenti: genomi equivalenti/ml, copie/ml, unità rilevabili PCR/ml. Per raggiungere l'obiettivo di armonizzare i risultati, è quindi necessario disporre di una preparazione standard il cui contenuto in acido nucleico virale sia espresso mediante un'unità di misura riconosciuta a livello internazionale.

A tal proposito è stato effettuato uno studio collaborativo dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) che ha coinvolto parecchi laboratori in tutto il mondo per codificare uno **Standard Internazionale** e determinare la quantità di acido nucleico in esso presente.

Gli standard internazionali sono calibrati in Unità Internazionali (UI) che contraddistinguono una unità di misura comune.

Le decisioni di fissare gli Standard Internazionali per i test NAT per i diversi virus sono state prese dal gruppo di Lavoro Internazionale denominato Standardisation of Genomic Amplification Technologies (SoGAT), gruppo costituito all'interno dell'ente inglese NIBSC che si occupa di sviluppare, valutare e fornire i materiali di riferimento per il processo di standardizzazione.

Il primo standard internazionale WHO per i test NAT è stato creato nel 1997 e si tratta dello Standard HCV-RNA (WHO 96/790) utilizzato anche dal nostro laboratorio (6). Attualmente le preparazioni standard per metodiche NAT distribuite dal NIBSC riguardano HCV-RNA, HIV-RNA, HBV-DNA, Parvovirus B19-DNA e HAV-RNA.

Conversione alle Unità Internazionali (UI) utilizzando lo standard HCV-RNA WHO 96/790

Nel Laboratorio Fleming-Research di Abbiategrasso (MI) è stata effettuata la conversione alle Unità internazionali della PCR-real time in uso per la quantizzazione di HCV-RNA.

Il test HCV-RNA quantitativo è stato eseguito con uno strumento real-time ABI 7000 SDS (Applera), utilizzando una curva standard costruita con i controlli REAL-TIME PCR CLONIT. Questi controlli sono costituiti da tutta la regione 5' UTR di HCV clonata in plasmide, quantizzata e fornita in diluizioni scalari pre-aliquotate e pronte all'uso dalla concentrazione di 10^6 copie/ml a 10^3 copie/ml (Clonit Cod. 05960209).

Per trovare il fattore di conversione tra Copie/ml e UI/ml sono stati utilizzati sia lo standard internazionale WHO HCV RNA (96/790 I) fornito dall'ente inglese NIBSC alla concentrazione di 10^5 IU/ml, che il pannello NAP HCV RNA calibrato sullo standard WHO (Acrometrix).

L'analisi di regressione ha mostrato una

buona correlazione con le diluizioni dello standard internazionale, le diluizioni inferiori a 100 copie/ml non sono state prese in considerazione poiché inferiori al limite di sensibilità della metodica.

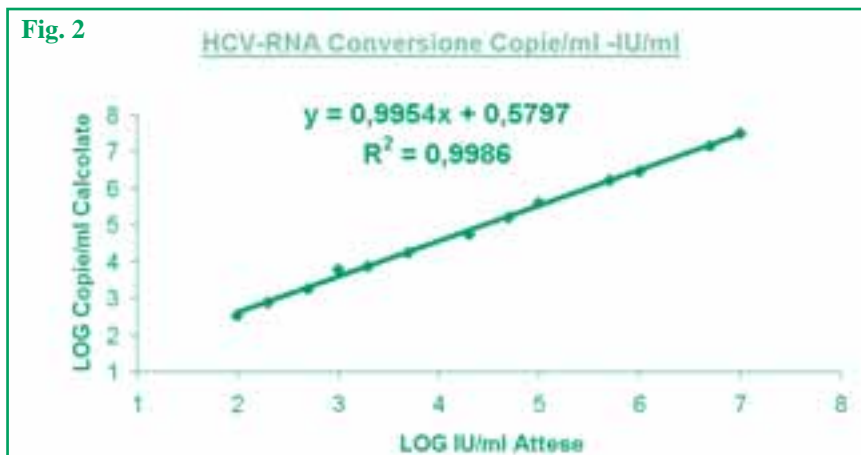
Dopo la trasformazione logaritmica dei risultati, è stata trovata una buona correlazione con i valori dello standard WHO espresso in unità internazionali (Fig. 2), con una pendenza vicino a 1,0 e una intercetta di 0,58. L'equazione della retta di regressione trovata è la seguente:

$$\text{Log Copie/ml} = (0,9954 \text{ Log IU/ml}) + 0,5797$$

Questa equazione indica che 1 UI è uguale all'incirca a **3,8** Copie, numero che esprime il **Fattore di conversione IU/Copie** della metodica HCV-RNA quantitativa in uso nel nostro laboratorio.

Bibliografia

- 1) Jung R., Soondrum K., Neumaier M.: Quantitative PCR. Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38(6):833-836
- 2) Metwally M. A., Roberts L. R., Petrovic L. M., Zein C. O., Montoya P., Zien N. N.: Previous and silent Hepatitis B infection in patients with chronic hepatitis C: risk factors for severe hepatic fibrosis. Hepatology 2002;36(4) Pt 2:1618
- 3) Enomoto M., Nishiguchi S., Shiomi S., Tanaka M., Yoko-gawa T., Fukuda K., Ueda T., Tamori A., Habu D., Takeda T., Yano Y., Otani S.: Changes in serum levels of Hepatitis C Virus genotype 1b monitored by real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of long term response to interferon-a treatment. The Am. Jour. of Gastroenterol. 2002; 97(2):420-5
- 4) Newell M.L., Pembrey L.: Mother-to child transmission of Hepatitis C Virus infection. Drugs today (Barc) 2002 May; 38(5):321-37.
- 5) Resti M.: Mother-to infant-transmission of hepatitis C virus. Ital.J.Gastroenterol. 1999; 31:489-493
- 6) Saldanha, J., Lelie, N., and Heath, A.: Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. Vox Sang 1999; 76(3):149-58



IL SEQUENZIAMENTO NELLA DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA CLINICA: Papillomavirus, Micobatteri, Legionelle, Mycoplasmi e Ureaplasmi

Davide Stangalini - Fleming Research srl
Massimiliano Valisi - Clonit srl
Chiara Sarasso - Molecular BioTechnology Srl (MBT)

THE DNA SEQUENCING INTO CLINICAL MICROBIOLOGY LABORATORIES

Accurate identification of bacterial isolates is an essential task of the clinical microbiology laboratory. For many slow-growing and fastidious organisms, traditional phenotypic identification is difficult and time-consuming. In addition, when phenotypic methods are used to identify bacteria, interpretation of test results involves substantial subjective judgement.

Sequencing analysis emerging as an alternative or complement to established phenotypic methods.

The DNA sequencing is the determination of the order of nucleotides (base sequences) in a DNA molecule, the sequence is read by separating the DNA copies by size. In modern DNA sequencing, the DNA sample is applied to one end of a capillary tube filled with a viscous liquid. An electric field is then applied across the tube. DNA is negatively charged (it has lots of phosphate groups) and will move towards an anode - the positively charged terminal. Separating molecules in this way is called electrophoresis.

The DNA molecules move through the liquid according to their size: the largest DNA molecules get 'caught up' in the molecules of the liquid and move relatively slowly; the smallest molecules are hampered less and move more quickly. The DNA copies

emerge from the end of the capillary tube smallest molecules first. Reading the sequence is done by illuminating the DNA, just before it emerges, with a laser to detect the 'coloured' tag on the dideoxy base at the end of the DNA copy. The colour of the emitted fluorescence is read by the detector and a base is assigned. The result is stored and assessed by software designed to test how reliable the base assignment is.

The availability of commercial PCR kit able to detect virus and bacteria and the confirmation on the positive sample by DNA sequencing can be used as rapid and reliable method for the identification and genotyping of HPV, MTB, Legionella, Mycoplasma and ureoplasma in the clinical microbiology laboratory.

Parallelamente all'utilizzo del Sequenziamento nel progetto Genoma Umano si è oggi arrivati a determinare la sequenza genica di un vasto numero di batteri e virus. L'utilizzo di queste conoscenze nei laboratori di diagnostica clinica permette oggi il sequenziamento del DNA di vari microrganismi per la loro tipizzazione dopo un esame di screening.

La massima informazione sulla struttura di una molecola di DNA si può ottenere determinandone la sequenza.

E' oggi relativamente facile determinare la sequenza nucleotidica di un fram-

mento di DNA isolato e purificato.

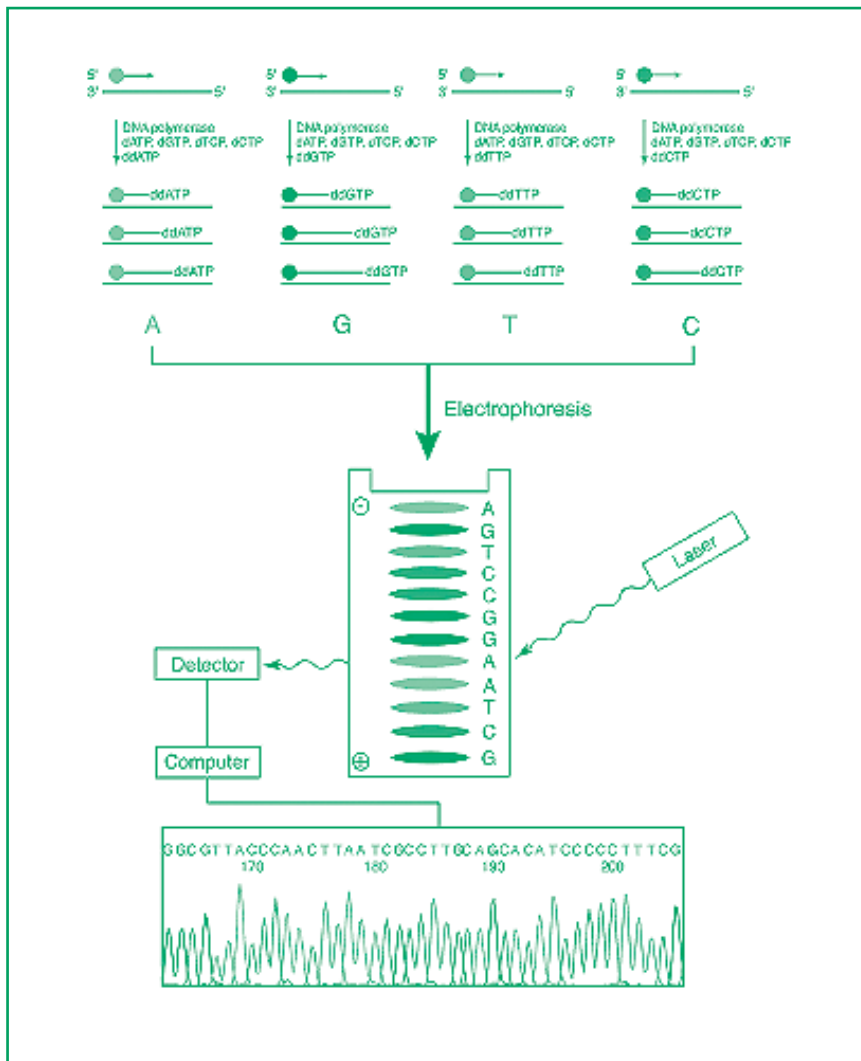
La tecnica utilizzata nei metodi automatici di Sequenziamento oggi disponibili affonda le sue radici nel metodo enzimatico di F. Sanger (Premio Nobel per il Sequenziamento nel 1980).

La reazione di sequenziamento viene eseguita in modo molto simile a una reazione di PCR: viene generata una serie di frammenti di DNA a singolo filamento e ciascuno più lungo di una base di DNA rispetto al precedente.

La reazione avviene tramite la sintesi di DNA da parte di un enzima polimerasi. Sono due le differenze principali

rispetto a una normale reazione di PCR: si usa un solo primer di DNA complementare alla regione da sequenziare e nella reazione ci sono dei nucleotidi corrispondenti alle quattro basi di DNA, marcati e modificati (Terminators) in modo da interrompere la reazione.

I frammenti, differendo come lunghezza di una sola base di DNA, vengono successivamente separati mediante elettroforesi su gel di poliaccrilamide. La separazione avviene in strumenti automatici che interpretano la sequenza dei Terminators, marcati con fluorocromi diversi a seconda delle basi di DNA.



La tecnica dell'elettroforesi capillare è stata adattata per l'utilizzo nei Sequenziatori di DNA. Specifici gel elettroforetici simili alla poliacrilamide, l'eccitazione tramite laser della fluorescenza dei Terminatori e la relativa analisi dell'emissione tramite camera CCD ne compongono l'apparato di lettura.

Complessi software di lettura e interpretazione rendono il lavoro del Biologo Molecolare molto più rapido per ottenere la Sequenza di DNA, che viene poi direttamente inviata a database per il confronto con tutte le sequenze note di microrganismi a livello mondiale. La risposta automatica e immediata che ne consegue è la specie di appartenenza della sequenza di DNA inviata.

L'applicazione combinata delle tecniche di Biologia Molecolare permette uno screening iniziale dei microrganismi da identificare (metodi PCR); il successivo utilizzo del Sequenziamento del DNA permette invece l'ulteriore tipizzazione di specie. E' possibile di conseguenza una applicazione pratica nella diagnostica clinica di alcuni agenti infettivi quali i Papillomavirus, i Micobatteri, le Legionelle, i Micoplasmii.

PAPILLOMAVIRUS

I papillomavirus (HPV) sono classificati come genere Papillomavirus della famiglia dei Papovavirus e il loro capsido icosaedrico contiene un doppio filamento circolare di DNA.

I papillomavirus inducono tumori cutanei ed in epiteli di rivestimento in genere; ciò spiega il nome di questo gruppo di virus (dal latino papilla, pustola con il suffisso greco -oma ad indicare tumore). Sono ora chiari i meccanismi cancerogenici dovuti all'inibizione, da parte di proteine del papillomavirus, delle proteine P53 e Rb che regolano la proliferazione cellulare.

In alcuni tumori i virus sono presenti in grande numero (un migliaio di virioni per grammo di tumore) e sono facili da isolare. Altri tumori contengono pochissime particelle virali e, in questo caso, fino a poco tempo fa, era impossibile la tipizzazione. Ciò era dovuto alla mancanza di opportuni sistemi di coltura cellulare, ora sostituiti da kit completi in PCR che permettono un rapido screening dei campioni e la successiva analisi di sequenza sull'amplificato positivo (KIT HPV Total - Cod. 05960400 - CLONIT srl, Milano).

La replicazione degli HPV avviene con la sintesi endocellulare del DNA virale atta a mantenere un numero fisso di copie del virus, che rimane costante per molte generazioni di cellule, in particolare nelle cellule del livello più basso del derma. La replicazione vegetativa avviene nelle cellule differenziate terminalmente all'epidermide. Nelle cellule differenziate terminalmente il virus perde il controllo della crescita e il DNA è replicato in un vasto numero di copie.

Il virus è espulso dalle cellule dell'epidermide quando queste si squamano ed è trasmesso attraverso contatto diretto (soprattutto le verruche genitali) e contatto indiretto.

La proliferazione virale è particolarmente favorita da stati di immunodepressione.

La ricerca del DNA degli HPV con il metodo PCR associata alla Citologia

e alla Colposcopia, permette di avere un quadro diagnostico completo, in grado di individuare la presenza di un'infezione latente. La fase successiva di Sequenziamento del DNA permette di identificare il tipo di HPV che infetta il paziente.

Al momento conosciamo un numero di papillomavirus superiore a 70 tipi: la regione del DNA L1 è la più conservata e quindi quella utilizzata per l'identificazione di screening degli HPV. All'interno di questa regione il DNA identifica vari sottotipi di virus HPV e quindi viene utilizzata per la tipizzazione, ed il metodo di riferimento rimane il sequenziamento, poiché evita alcuni problemi di specificità rispetto ai metodi con sonde.

La tipizzazione, come noto, risulta importante per differenziare i tipi a maggior rischio: l'HPV 16 viene riscontrato nel 50% dei carcinomi anogenitali a cellule squamose e l'HPV18 è presente nel 56 % degli adenocarcinomi, i tipi a medio rischio come l'HPV 45 e l'HPV 31 sono presenti nel 5-8 % dei tumori ano-genitali, mentre i rimanenti tipi di HPV sono a basso rischio.

MICOBATTERI

La ricerca dei Micobatteri (MTB DNA) con il metodo PCR è particolarmente indicata per una diagnosi rapida in confronto ai lunghi tempi dei metodi di coltura. La nostra esperienza di Laboratorio si è concretizzata ("Valutazione dell'Amplificor MTB PCR nella diagnostica diretta del *Mycobacterium tuberculosis complex*" *Micr.Med.* vol.9 N.4 1994) analizzando oltre 1200 casi di cui 800 positivi, confrontando i metodi PCR, colturali e microscopici ed è stata condotta utilizzando una regione 16sRNA specifica per i Micobatteri appartenenti al gruppo *complex* (*M. tuberculosis*, *M.*

bovis, *M. africanum*, *M. microti*). Il metodo PCR si è rivelato nel confronto con le altre metodiche altamente sensibile e specifico. L'analisi per il *Mycobacterium complex* si è esteso alla identificazione di tutti i Micobatteri, compresi quelli definiti Micobatteri atipici (MOTT) i quali presentano sovente interesse clinico rilevante, come le infezioni polmonari da *M. kansasii* o *M. fortuitum* o *M. chelonae*.

I Micobatteri del gruppo *avium*, sono talvolta responsabili di infezioni in pazienti immunocompromessi. Il *Mycobacterium paratuberculosis* è stato identificato come causa di infezioni intestinali di ruminanti e riscontrato anche nel latte; nell'uomo si è trovata una correlazione tra *M. paratuberculosis* e il morbo di Crohn. Infine altri micobatteri solitamente poco ricercati, come il *Mycobacterium marinum*, è stato riscontrato in tubercoli sulle braccia di appassionati di acquariologia tropicale.

Il Sequenziamento delle specie di Micobatteri, dopo il riscontro di Micobatteri spp DNA, è da considerare una necessità di diagnostica clinica importante.

LEGIONELLE

La Legionella è un batterio gram negativo responsabile di infezioni polmonari. L'infezione avviene principalmente per inalazione da contatto con acqua infetta. Si stima che circa il 5% delle polmoniti siano causate da Legionella e si osservano nel 15% delle polmoniti da Legionella, in particolare nei pazienti immunocompromessi e anziani, complicazioni ad altri organi: fegato, milza, tratto gastrointestinale, sistema nervoso centrale.

I test che utilizzano la PCR per la diagnosi di Legionella in confronto alle tecniche microbiologiche classiche

permettono un trattamento precoce dei pazienti ed evitano le interferenze dovute alla presenza dei numerosi batteri orofaringei. La ricerca con il metodo PCR può riguardare le Legionelle spp (seguita eventualmente da tipizzazione con Sequenziamento) oppure la ricerca diretta della Legionella pneumophila (KIT L. pneumophila gene MIP- Cod. 05960530 - CLONIT srl, Milano) responsabile del 70% delle polmoniti da Legionella.

L'analisi di screening con PCR delle Legionelle spp comincia ad essere utilizzata anche nelle analisi ambientali delle acque in strutture pubbliche e private (condizionatori e impianti idrico-sanitari sono facilmente serbatoi di crescita per le Legionelle). Anche in queste indagini la tipizzazione con il Sequenziamento può risultare un utile approfondimento epidemiologico.

MICOPLASMI E UREAPLASMI

I Micoplasmi e gli Ureaplasmi appartengono alla stessa famiglia delle Mycoplasmataceae e sono spesso associati a uretriti non gonococciche (NGU), infezioni pelviche, aborti spontanei, febbri post-parto. Sono state isolate nell'uomo 13 specie di Micoplasmi e 2 di Ureaplasmi.

I maggiori responsabili delle infezioni uro-genitali sono ritenuti il *Mycoplasma genitalium*, l'*Ureaplasma urealyticum* e l'*Ureaplasma parvum*.

A causa delle difficoltà di coltura, in particolare per *M. genitalium* ed in pazienti in terapia antibiotica, la ricerca con il metodo PCR dei Micoplasmi DNA (comprendente tutte le specie di Micoplasmi e Ureaplasmi) risulta particolarmente utile nella Diagnostica Clinica. Il successivo Sequenziamento della regione interna permette di identificare il *Mycoplasma* o *Ureaplasma* responsabile dell'infezione.

DIAGNOSTICA MOLECOLARE IN PARASSITOLOGIA

Prof. Massimo Scaglia - Dip. Malattie Infettive, Università-IRCSS S. Matteo, Pavia

Dr. Simonetta Gatti - Lab. Parassitologia, Serv. Virologia, IRCSS S. Matteo, Pavia

Drs. Stefania Madama, Dr. Maurizio Gramegna - Clonit srl - Milano

MOLECULAR DIAGNOSTIC IN PARASITOLOGY

Polymerase chain reaction (PCR) is a common method of creating copies of specific fragments of DNA. Medical research and clinical medicine are profiting from PCR mainly in two areas: detection of infectious disease organisms and detection of variations and mutations especially in human genes. The method is especially useful for searching out disease organisms that are difficult or impossible to culture, such as many kinds of protozoa: *Entamoeba* spp, *Plasmodium* spp and *Leishmania* spp:

The existence of two species of *Entamoeba* histolytica, the pathogenic strains to *E. histolytica* sensu stricto and the non-pathogenic strains to *E. dispar* has been supported by analysis of the gene encoding for the small subunit ribosomal RNA.

On the basis of rDNA data, 2 primers were designed to produce polymerase chain reaction amplification from both *E. histolytica* and *dispar*. The reliability of this method of identification was assessed comparing the results with those based on gold-standard method isoenzyme analysis.

The use of PCR for the diagnosis of Malaria has promoted an increase in confirmed cases of disease. This method allows the identification of the *Plasmodium* species involved in the infections

and the confirmation of the effectiveness of drug treatments.

PCR based detection of *Leishmania* from different types of clinical specimens has been further streamlined for field use by simplifying sample preparation. PCR reaction has been developed to detect the *Leishmania* genus. PCR has been demonstrated more rapid and sensitive than classic diagnostic techniques, such as microscopy and parasite culture. The characteristics described here significantly improve the feasibility of using the PCR in endemic countries as the primary method for detection and preliminary characterization of *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis.

Le tecniche di amplificazione e determinazione genica applicate alla Parassitologia si sono dimostrate un valido supporto alle tradizionali tecniche diagnostiche.

L'introduzione di sistemi basati sulla rivelazione diretta di sequenze genomiche specifiche in un campione biologico nasce dall'esigenza di avere a disposizione metodologie in grado di determinare con un'elevata soglia di sensibilità e con estrema specificità anche poche copie della sequenza genica d'interesse.

In particolare l'attenzione viene focalizzata sulla **reazione a catena della polimerasi (PCR)** che si è dimostrata

piuttosto efficace per l'identificazione degli agenti patogeni responsabili delle parassitosi più diffuse a livello mondiale.

Durante il processo di amplificazione i filamenti della doppia elica di DNA vengono **denaturati al calore** e successivamente **ibridati ai primer**, corte sequenze oligonucleotidiche che dirigono la sintesi di una catena di DNA complementare per mezzo dell'enzima Taq polimerasi.

I prodotti ottenuti dalla reazione di estensione diventano substrati per la reazione successiva, innescando il **processo a catena** che dà origine ad amplificazione esponenziale della sequenza di DNA inizialmente presente nel campione.

La possibilità di ottenere buoni risultati con le metodiche di biologia molecolare è fortemente condizionata dall'efficienza del **sistema di estrazione** che deve consentire di recuperare l'acido nucleico dal campione biologico in buona percentuale e con sufficiente grado di purezza.

La presenza di inibitori della Taq polimerasi o di DNAsi può infatti dar luogo a falsi negativi.

Per ottenere acidi nucleici che rispondano alle caratteristiche precedentemente enunciate è necessario ottimizzare i sistemi di estrazione in relazione ai campioni biologici di partenza (siero, sangue, muco, tessuto, ecc.).

Tab. 1

Eliminazione dei globuli rossi ed emoglobina	Lavaggio con soluzione ipotonica	Citocentrifugato o buffy-coat
Disponibilità acido nucleico	Digestione enzimatica con Proteinasi K	Lisi diretta mediante agenti caotropici
Purificazione di acido nucleico	Digestione enzimatica con Proteinasi K	Impiego di colonnine con filtri a resine o silice
Recupero acido nucleico	Precipitazione con alcool	Eluizione da colonnina
Storage dell'acido nucleico (DNA)	A 4° C per alcuni giorni	A -20° C per mesi

La Tab. 1 riassume le fasi di un protocollo di estrazione standard.

Al fine di migliorare l'efficienza del processo i **parametri fondamentali** su cui intervenire sono:

● **Scelta dei primer e loro caratteristiche**

i primer infatti hanno doppio ruolo: nei primi cicli ciascuno di essi funziona da **sonda**, ovvero "cerca" lungo il genoma la sequenza specifica a cui legarsi con il corretto orientamento e, una volta selezionata la regione da amplificare, agisce da **vettore dell'amplificazione**.

● **Ottimizzazione delle concentrazioni dei principali costituenti la soluzione di amplificazione**

(concentrazione primer, dNTP, ioni magnesio, ecc.).

● **Scelta delle temperature di annealing e protocolli di amplificazione**

aumentando la temperatura di annea-

ling le condizioni di reazione diventano più stringenti e si riduce la formazione di prodotti aspecifici.

L'uso di DNA polimerasi termostabile e la disponibilità di strumenti termociclatori che permettono la ripetizione automatica dei cicli di reazione ha contribuito alla diffusione delle tecniche di amplificazione degli acidi nucleici.

L'ultima fase nell'allestimento di un saggio PCR riguarda la valutazione del prodotto di reazione.

Il rilevamento mediante elettroforesi su gel della positività del campione rappresenta uno dei sistemi più veloci ed intuitivi.

Si tratta di una corsa elettroforetica in un campo elettrico a intensità e direzione costante, il DNA amplificato, colorato con etidio bromuro, viene visualizzato ai raggi UV. (Fig. 1 - Pozzetto n°1:

Molecular Weight Marker; pozzetti n° 2,3,4,5,6,7: banda superiore = controllo interno; pozzetti n° 2,3,4,5: banda inferiore = diluizione scalare del campione positivo).

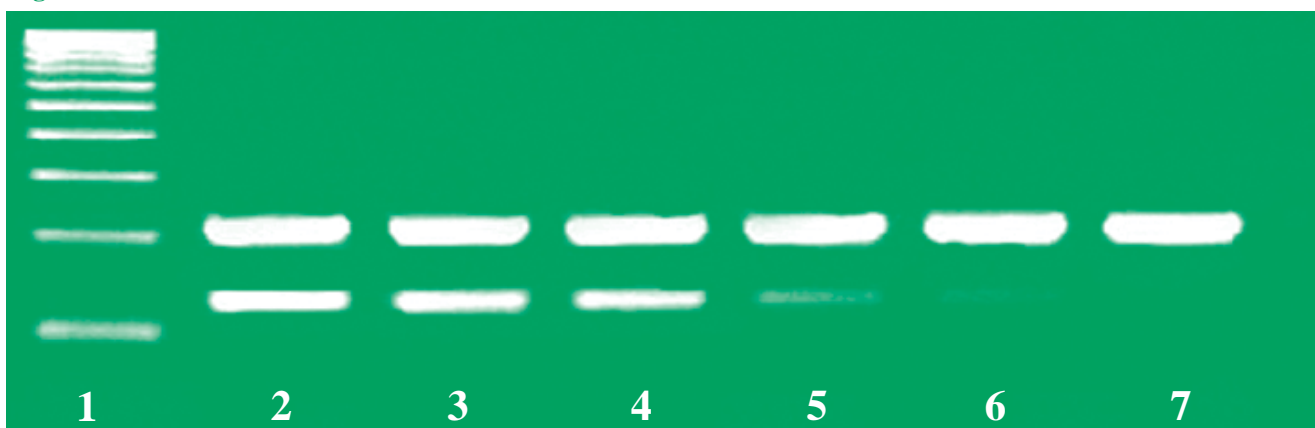
L'approccio classico nella diagnosi dell'eziologia specifica di una malattia infettiva si basa, ad esempio, su :

1) l'identificazione morfologica/fisiologica del patogeno isolato dall'organismo malato;

2) l'analisi sierologica volta all'identificazione degli anticorpi sviluppati dall'ospite.

In entrambi i casi esistono una serie di limiti al loro impiego, in particolare, l'esame microscopico diretto è spesso caratterizzato da scarsa sensibilità e specificità, mentre i metodi immunologici sono spesso viziati dalla mancanza di correlazione assoluta tra risposta anticorpale ed infezione attiva (infezione progressa).

Fig. 1



Per tali motivi la PCR si è dimostrata un valido supporto diagnostico per importanti parassitosi quali:

AMEBIASI

L'infezione indotta da *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* è conosciuta come amebosi intestinale ed è localizzata elettivamente a livello del cieco e dell'intestino crasso. L'infezione intestinale può eventualmente complicarsi con forme pseudo-ascessuali, soprattutto a livello epatico.

I compartimenti sopra descritti individuano con precisione i materiali biologici di elezione da cui inizialmente partire per la ricerca di *Entamoeba* spp.: campioni di feci a fresco o fissate in formalina. Nelle zone endemiche tropicali e subtropicali, le infezioni amebiche, coinvolgono circa mezzo miliardo di persone, solo il 10-12% dei soggetti infetti sviluppa forme di malattia clinicamente conclamata, la restante percentuale sviluppa forme asintomatiche. Ciò dipende dal fatto che esistono in natura due specie morfologicamente identiche, caratterizzate da differente **patogenicità**:

- 1) *Entamoeba histolytica* patogena e causa di forme clinicamente manifeste;
- 2) *Entamoeba dispar* non patogena, presente come semplice commensale intestinale.

La differente patogenicità rende necessaria una corretta tipizzazione biochimica e molecolare per identificare i ceppi patogeni e, solo in tal caso, giustificare l'intervento terapeutico.

Il protocollo tradizionale utilizza **tecniche colturali e di tipizzazione immunoenzimatica** piuttosto laboriose e complesse e **tecniche sierologiche** non applicabili se non in presenza di risposta anti-

corpale indotta solo dalle lesioni caratteristiche di *Entamoeba histolytica*. A fronte di tali limiti le tecniche di amplificazione si sono rivelate fondamentali per rendere più **rapida e precisa** l'identificazione delle due specie rispetto ai metodi diagnostici fino ad ora utilizzati.

MALARIA

In questi casi la biologia molecolare è in grado di risolvere il dubbio diagnostico frequente in caso di **bassa parassitemia e coinfezioni** e di identificare la specie di *Plasmodium* presente. La variabilità di sequenza intraspecie o "microeterogeneità" può essere molto utile per disegnare primer/sonde in grado sia di identificare che distinguere gli isolati patogeni. Proprio su questa variabilità si basa l'identificazione della specie, fondamentale per definire l'urgenza del trattamento farmacologico in pazienti con infezione da *P. falciparum*.

Si utilizzano allo scopo quattro diverse **coppie di primer specie-specifiche** che permettono di identificare la specie presente.

Tali metodiche consentono di confermare una diagnosi anche utilizzando DNA estratto da striscio ematico su vetrino per l'identificazione microscopica. Il materiale d'elezione è il sangue periferico. (Fig. 2: trofozoiti ad anello di *Plasmodium falciparum* all'interno di un eritrocita).

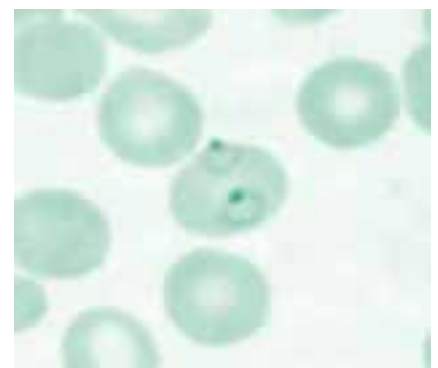
LEISHMANIOSI

Molte specie di flebotomi sono considerate vettori di trasmissione di *Leishmania* spp. con circa 100 specie di animali che fungono da potenziali "reservoir". Fra le specie animali, i cani sono un importante bacino d'infezione.

Amastigoti di *Leishmania* spp. sono stati identificati in aspirati di milza, midollo, linfonodo, fegato, ma anche da sangue periferico. I metodi microscopici e colturali che permettono di rilevare la presenza dell'agente eziologico direttamente nel campione biologico in esame rappresentano le tecniche di base ancora oggi utilizzate dai laboratori diagnostici. Tuttavia, per alcuni casi di infezione sviluppatasi in pazienti immunocompromessi, queste tecniche si sono rivelate spesso troppo poco sensibili.

Recenti studi hanno evidenziato l'**elevata sensibilità e specificità dei metodi di biologia molecolare** (*Leishmania* Kit - cod. number: 05960630 - Clonit.Srl) soprattutto in riferimento alle indagini condotte su pazienti immunocompromessi, soggetti ipo o asintomatici, in caso di campioni biologici ottenibili solo con tecniche invasive o quando la carica parassitaria è molto scarsa. In questi casi le tecniche di indagine biomolecolare vengono considerate **un'alternativa affidabile e non invasiva** per lo screening di soggetti con sospetta leishmaniosi viscerale, in caso di recidive o reinfezioni in soggetti immunocompromessi ed infine come verifica della completa guarigione clinica e parassitologica dei pazienti a seguito di adeguato trattamento eziologico.

Fig. 2





Ricerca, Sviluppo
e Produzione
per la Diagnostica
in Biologia Molecolare

KIT COMPLETI DI AMPLIFICAZIONE GENICA PER:

DIAGNOSTICA UMANA

VIRUS

Hepatitis B virus (HBV)
Hepatitis C virus (HCV)
Human Immunodeficiency
Virus (HIV)
Citomegalovirus (CMV)
Epstein-Barr Virus (EBV)
Human Papilloma Virus (HPV)
Parvovirus B19 (B19V)
Herpes Simplex Virus (HSV 1)
JC Virus (JCV)
Poliovirus (PV)
Varicella Zoster Virus (VZV)
Human SARS CoV *

BATTERI

Mycobacterium tuberculosis
Helicobacter pylori
Chlamydia trachomatis
Chlamydia pneumoniae
Mycoplasma pneumoniae
Legionella pneumophila
Borrelia burgdorferi
Periodontal Disease Multiplex
Listeria monocytogenes
E.coli O157:H7
Salmonella
Bacillus anthracis

PROTOZOI

Toxoplasma gondii
Plasmodium falciparum
Plasmodium ovale
Plasmodium vivax
Plasmodium malariae
Leishmania

GENETICA ed ONCOLOGIA

Fattore V di Leiden
Fattore II G20210A
MTHFR C677T
Test di Paternità
Melanoma

STANDARD
di CALIBRAZIONE
REAL-TIME PCR

CONTROLLO
DI SEDUTA

DIAGNOSTICA
ALIMENTARE

Listeria monocytogenes
E. coli O157:H7
Salmonella
Bacillus cereus

DIAGNOSTICA
VETERINARIA

FIPV
(Feline infectious peritonitis virus)

* In corso di validazione presso I.S.S.



20139 Milano Via B. Quaranta, 57
Tel: +39 02 56814413 - Fax: +39 02 56814515
Email: info@clonit.it - www.clonit.it

I prodotti di **BIOLOGIA MOLECOLARE**
sono prodotti in esclusiva per



Direzione Commerciale: 20126 Milano-Viale Sarca,223
Tel.02.64.222.1 - Fax 02.64.222.61
Sede Legale: 65020 Alanno Scalo (PE)
Contrada S.Emidio Tel.085.85.711-Fax 085.85.41.625

TROMBOFILIA EREDITARIA

Diagnosi simultanea delle tre principali mutazioni

Drs. Stefania Madama - Università degli Studi di Milano
Dr. Carlo Rocco, Dr. Davide Stangalini - Fleming Research - Abbiategrasso
Dr. Massimiliano Valisi - Clonit srl - Milano

GENETIC THROMBOPHILIA

Venous thrombotic events (VTE) is the obstruction of the circulation by clots that have been formed locally in the veins or have been released from thrombus elsewhere.

The usual sites of thrombus formation are the superficial and deep veins of the legs, but it also may occur in the veins in the brain, retina, liver, and mesentery.

An important question is whether the risk for the development of the venous thrombosis can be

predicted. Apart from the local activation of the coagulation system by e.g., trauma, surgery, immobilisation, pregnancy and use of oral contraceptives, also the genetic background of an individual plays an important role.

An increased risk of venous thrombosis can last throughout life because of the presence of mutations in genes encoding proteins, involved in the hemostatic or fibrinolytic processes.

The pathogenesis of venous thrombosis is complex, involving the interaction of acquired risk factors with several genetic predisposition, including protein C resistance caused by a point mutation in the Factor V gene (arginine 506 to glutamine) referred to as Factor V Leiden, muta-

tion in the prothrombin gene (Factor II) and MTHFR (methylene tetrahydrofolate reductase).

The mutations in each of these genes are well conserved, single-nucleotide substitutions for which direct DNA-based assays are being increasingly used to determine thrombotic risk. In comparison, the more widely recognized defects in the anticoagulant proteins-antithrombin III, protein C, and protein S-are found collectively in less than 10% of all VTE patients.

CLONIT Thrombophilia Kit consist of a complete amplification system based on ddNTPs primer extension reaction for the simultaneous detection of the three relevant mutations in inherited thrombophilia.

Le patologie cardiovascolari (Cardiovascular Disease - CVD) rientrano tra le più comuni cause di mortalità nei Paesi Occidentali.

Dati clinici evidenziano che i tradizionali fattori di rischio, quali ipercolesterolemia, ipertensione, diabete, fumo e obesità, non sempre rendono ragione di pato-

logie cardiovascolari precoci.

Nel 50% dei soggetti che sviluppano tali problemi cardiovascolari l'unico fattore di rischio evidente è una **predisposizione genetica** allo sviluppo della patologia, in questo caso, si parla di **Trombofilia Ereditaria**.

Si tratta di una tipica malattia multifat-

toriale provocata dall'interazione di più "fattori acquisiti", ossia dalla presenza simultanea di mutazioni i cui effetti possono **alterare la cascata coagulativa**.

Le principali mutazioni riconosciute come responsabili di tale patologia sono le seguenti:

Mutazione	Gene	Localizzazione	Variatione Nucleotidica	Variatione Aminoacidica
G1691A	Fattore V	Esone 10	G-1691>A	Arg-506 ÆGlu
G20210A	Fattore II	3' UTR	G-21210>A	3' Splice Mut.
C677T	MTHFR	Esone 4	C-677>T	Ala- ÆVal

FATTORE V DI LEIDEN

Il fattore V attivato è un cofattore essenziale per l'attivazione della pro-

trombina a trombina. Il suo effetto procoagulante è normalmente inibito dalla Proteina C attivata che taglia il Fattore V attivato in tre parti.

La mutazione **G1691A**, ossia la **sostituzione** di una G (guanina) con una A (adenina), quando presente impedisce il taglio da parte della proteina C attivata,

ne consegue una maggiore attività pro-coagulante del fattore V attivato ed aumentata predisposizione ad eventi trombotici.

Tale variante è definita variante di Leiden (località in cui fu scoperta) ed ha una frequenza genica dell'1,4 – 4,2% in Europa con una frequenza di portatori in eterozigosi in Italia pari al 2-3%, mentre l'omozigotità per tale mutazione ha un'incidenza di 1:5000. I soggetti eterozigoti hanno un rischio 8 volte superiore di sviluppare una trombosi venosa, mentre gli omozigoti hanno un rischio pari a 80 volte.

L'evento trombotico è favorito, inoltre, in presenza di condizioni predisponenti quali la gravidanza, l'assunzione di contraccettivi orali, gli interventi chirurgici.

In gravidanza, una condizione genetica di eterozigosi per il Fattore Leiden è considerata predisponente all'aborto spontaneo, ai difetti placentari, alla Sindrome di HELLP (emolisi, elevazione enzimi epatici, piastrinopenia), pertanto, sia in questo caso sia in caso di interventi chirurgici, è consigliata profilassi anti-coagulante.

FATTORE II O PROTROMBINA

La protrombina o fattore II della coagulazione svolge un ruolo fondamentale nella cascata coagulativa in quanto la sua attivazione in trombina porta alla trasformazione del fibrinogeno in fibrina e quindi alla formazione del coagulo. La **sostituzione** di una G con una A in posizione 20210, alterando la **regolazione genica post-trascrizionale**, induce la formazione di elevati livelli di protrombina funzionale nel plasma con conseguente aumento rischio di trombosi specie di tipo venosa.

La frequenza genica della variante è bassa (1,0-1,5%) con una percentuale di eterozigosi del 2-3%. L'omozigosi è rara.

Nei casi di eterozigosi c'è un rischio aumentato di 3-5 volte di sviluppare trombosi venosa, ictus ischemico, infarto del miocardio in donne giovani, 1,5 volte per gli uomini, 7 volte nei diabetici, 10 volte per trombosi delle vene cerebrali e 149 volte in donne che assumono contraccettivi orali.

MTHFR 677

(METILENTETRAIDROFOLATOREDUCTASI)

Si tratta di un enzima coinvolto nella rimetilazione della omocisteina a metionina per mezzo della vitamina B12.

Il polimorfismo genetico dovuto alla **sostituzione** di una C (citosina) in T (timina) al nucleotide 677 determina una **riduzione dell'attività enzimatica dell'MTHFR** pari al 50%. La presenza di tale mutazione, che determina un aumento del livello di omocisteina nel sangue, è un importante fattore di rischio per malattia vascolare (trombosi arteriosa).

Rare mutazioni (trasmesse con modalità autosomica recessiva) possono causare la riduzione dell'attività enzimatica di MTHFR al di sotto del 20% con conseguente sintomatologia clinica caratterizzata da ritardo dello sviluppo psico-motorio e massivi fenomeni trombotici.

La frequenza genica in Europa della mutazione è del 3-3,7% che comporta una condizione di eterozigosi in circa il 42-46% della popolazione e di omozigosi pari al 12-13%.

Inoltre condizioni di eterozigosi doppia, specie con la variante di Leiden o del Fattore II, determinano un aumento del rischio relativo per il tromboembolismo venoso, già alto per la presenza dell'altra mutazione.

L'analisi molecolare per l'individuazione delle mutazioni a carico dei geni del Fattore V, Fattore II e MTHFR, responsabili di Trombofilia Ereditaria prevede il seguente protocollo diagnostico:

- Estrazione di DNA da sangue intero con EDTA;
- Amplificazione in singola per i tre fattori utilizzando il medesimo protocollo di PCR (Polymerase chain reaction);
- Purificazione con metodo enzimatico EXO I/SAP: mediante trattamento dei prodotti di PCR con Esonucleasi I (EXO I) e fosfatasi alcalina (SAP) per eliminare possibili inibitori e contaminanti delle fasi successive; in particolare l'enzima esonucleasi degrada i primer che non si sono appaiati durante la fase di annealing dell'amplificazione e la fosfatasi alcalina degrada i dNTP rimasti liberi in soluzione;
- Reazione di Minisequencing per individuare le mutazioni (Metodo di Sanger modificato, chimica dei ddTerminatori). Si tratta di una reazione di sequenza che utilizza la chimica dei ddTerminatori. Dopo la fase di annealing del primer al template, durante la fase di extension avviene l'incorporazione di un singolo ddNTP marcato con un colorante fluorescente e complementare alla base sede della mutazione d'interesse. Il primer di minisequencing è disegnato in modo tale da appaiarsi al DNA stampo immediatamente a monte del sito di mutazione e da incorporare il ddNTP marcato complementare solo in tale posizione, con conseguente blocco della reazione di sequenza. Questo processo viene ripetuto in cicli successivi di extension e terminazione, producendo così frammenti marcati rilevati mediante corsa elettroforetica;
- Analisi mediante elettroforesi capillare su Sequenziatore Automatico di DNA;
- Interpretazione dei dati sulla base dei picchi di fluorescenza rilevati nei cromatogrammi.

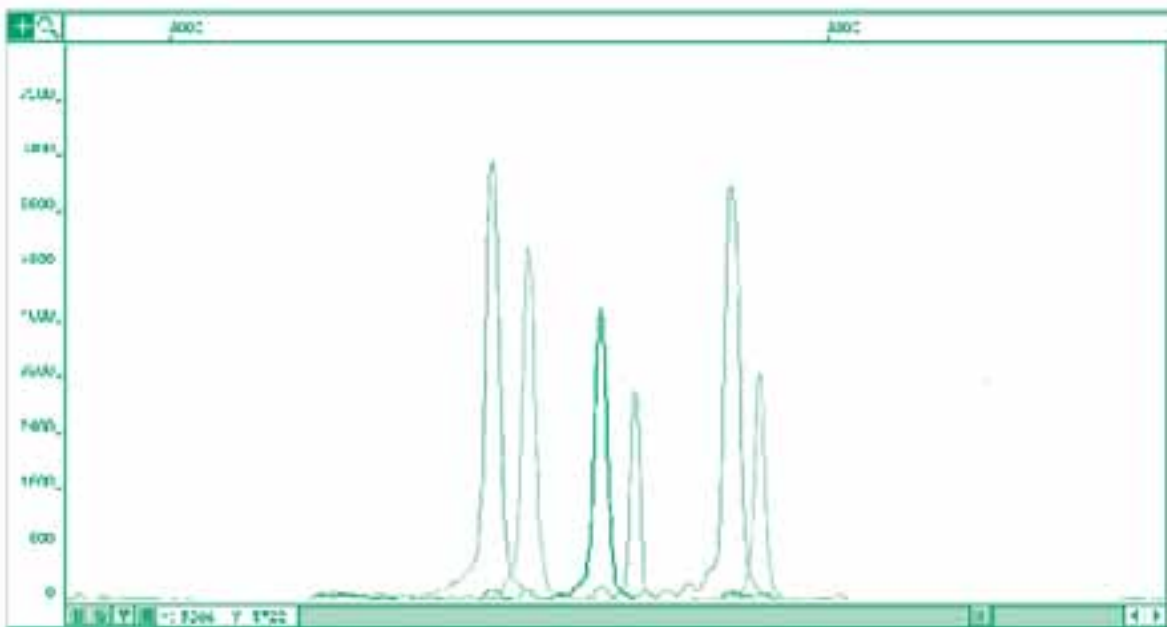
RICERCA DELLE MUTAZIONI RESPONSABILI DI TROMBOFILIA EREDITARIA TRAMITE SEQUENZIAZIONE DI DNA

Ad ogni picco di fluorescenza rilevato sui cromatogrammi corrisponde una determinata base nucleotidica incorporata

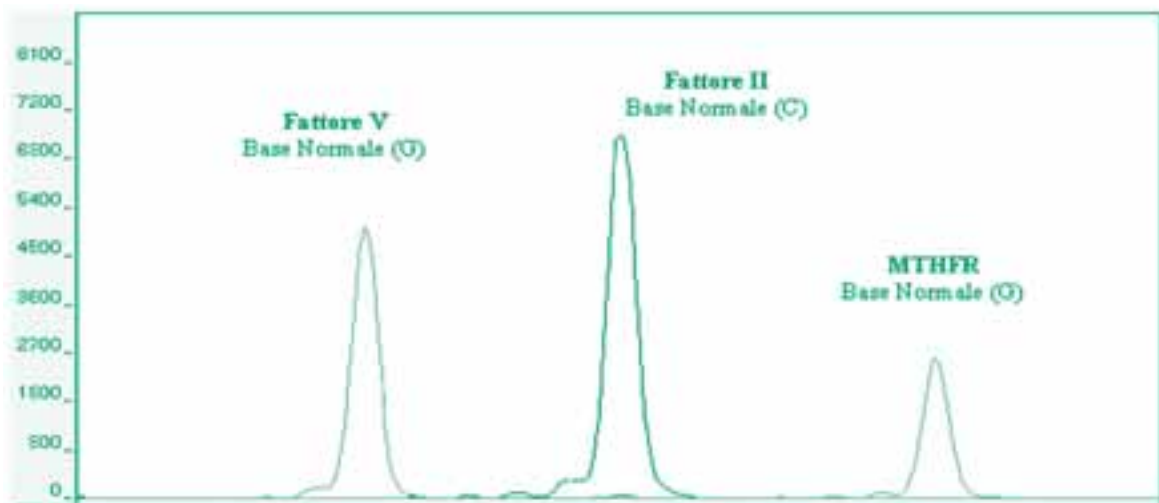
nel corso della reazione di Minisequencing; è quindi sufficiente comparare i picchi ottenuti per ciascun

campione analizzato con i picchi “wild type” per identificare l’eventuale presenza di mutazioni.

Campione eterozigote con mutazioni a livello dei geni Fattore V, Fattore II e MTHFR



Campione omozigote (Wild type)



RICERCA DELLE MICROMETASTASI LINFONODALI NEL CARCINOMA POLMONARE MEDIANTE VALUTAZIONE QUANTITATIVA DELL'RNA MESSAGGERO DEL CEA

Dr.ssa Francesca Alessi - Università degli Studi di Milano e Clonit srl

Dr. Carlo Roccio - Fleming Research, Milano

Prof. Silvano Bosari - Università degli Studi di Milano, Ospedale San Paolo

QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR DETECTION OF LUNG CANCER MICROMETASTASES USING CEA MRNA AS A MARKER.

Lung cancer is the most common cause of death by malignancy in the industrialized coun-

tries. Approximately 30%-40% of patients who undergo surgical resection of non-small cell lung cancer without overt metastases have a relapse within 24 months after surgery. This valuation suggests that an occult tumor load is the major reason for the high mortality in surgically treated lung cancer patients.

The purpose of this study has been to evaluate the utility of CEA mRNA as a marker for occult micrometastases with real time quantitative RT-PCR. For quantitative analysis of the number of

metastatic tumor cells per lymph node, standard curve has been created from CEA-expressing tumor cell line. CEA mRNA has been identified in 17 of 148 lymph nodes determined to be free of tumor by hematoxylin and eosin staining belonging to 14 patients. Among this we observed tendency to develop early recurrences and distant metastases. The real-time RT-PCR analysis of CEA mRNA in lymph nodes seems to be a promising tool for the early detection of micrometastatic cells in patients with lung cancer.

EPIDEMIOLOGIA DEL TUMORE AL POLMONE

Il carcinoma polmonare è la più rilevante neoplasia umana per incidenza e mortalità nei paesi industrializzati, in particolare nel Nord America ed in Europa.

I principali fattori di rischio annessi a questa patologia sono il fumo e l'esposizione ad inquinanti industriali.

Le principali caratteristiche di questa patologia, oltre alla elevata frequenza di

incidenza, sono la prognosi infausta e l'alta aggressività del tumore con tendenza alla recidiva.

Negli ultimi venti anni, infatti, si è osservato solamente un modesto miglioramento nelle frequenze di sopravvivenza dovuto alla mancanza di un test di screening, soddisfacente ed ampiamente applicabile, che possa identificare il tumore ai primi stadi di malattia.

Per queste motivazioni è sempre più forte l'esigenza di un miglior inquadra-

mento diagnostico dei pazienti per selezionare principalmente quelli in stadio precoce di malattia e ad alto rischio di ricaduta.

FATTORI PROGNOSTICI

La identificazione precoce delle micrometastasi è di primaria importanza per una corretta stadiazione alla diagnosi e per identificare i pazienti più a rischio di recidiva di malattia.

Studi retrospettivi evidenziano che il 30-40% dei pazienti sottoposti ad inter-

DOSAGGIO QUANTITATIVO DELL'RNA MESSAGGERO DEL CEA IN PAZIENTI AFFETTI DA CARCINOMA POLMONARE

PAZIENTI N.	LINFONODI N.	LINFONODI POSITIVI N.	LINFONODI NEGATIVI N.	PAZIENTI POSITIVI N.	PAZIENTI NEGATIVI N.	STADIO PAZIENTI		
						N. 1	N. 6	N. 5
44	148	17	134	14	30	N0→N1	N0→N2	N1→N2

vento chirurgico e portatori di cancro al polmone in stadio precoce mostrano una ripresa di malattia entro i 24 mesi dalla chirurgia.

Questo fenomeno è dovuto alla metastatizzazione di cellule tumorali che permangono durante la remissione clinica e che non sono identificabili con le procedure diagnostiche standard.

Questo dato suggerisce una inadeguatezza delle procedure routinarie utilizzate per l'identificazione delle cellule tumorali metastatiche.

RICERCA DELLE MICROMETASTASI

Le cellule neoplastiche metastatizzano principalmente secondo due vie di diffusione, una ematogena e l'altra linfatica.

Le principali sedi indagate per la presenza di cellule tumorali isolate riguardano quindi gli aspirati midollari, il sangue periferico e i linfonodi locoregionali.

La identificazione delle cellule tumorali isolate in linfonodi senza compromissione istopatologica ha mostrato essere prognosticamente importante in un elevato numero di studi.

Questi risultati enfatizzano l'importanza di verificare lo stato linfonodale che può quindi perfezionare la stadiazione del tumore e può fornire criteri addizionali per la somministrazione di terapie adiuvanti.

La possibilità di rilievo di metastasi occulte è strettamente dipendente dalla metodica utilizzata e dalla molecola target, specifico marcatore neoplastico, che si ricerca nel tessuto oggetto dello studio.

Le metodiche molecolari risultano ad oggi più sensibili dell'immunoistochimica nella possibilità di rilievo di metastasi occulte.

In questo studio ci si propone di valutare l'RNA messaggero del CEA (carcinoembryonic antigen), una glicoproteina di superficie implicata nei fenomeni di adesione cellulare, quale marker tumorale di micrometastasi in un'ampia serie di linfonodi polmonari appartenenti a 44 pazienti affetti da carcinoma polmonare a diversi stadi patologici, cioè con (N1-N2) e senza (N0) compromissione linfonodale all'esame istopatologico con ematossilina-eosina.

METODICHE

La valutazione quantitativa del target d'interesse, il CEA è stata effettuata mediante real-time RT-PCR utilizzando il metodo della curva standard costruita con una linea cellulare tumorale CEA positiva.

La valutazione del numero di cellule tumorali CEA positive per linfonodo è stata ottenuta, dopo amplificazione in real-time RT-PCR per interpolazione dalla curva stessa.

RISULTATI

La valutazione molecolare dei 148 linfonodi locoregionali ha permesso di rile-

vare 26 linfonodi sedi di metastasi, 17 dei quali avevano la controparte negativa per la presenza di micrometastasi con valutazione istologica.

I 17 linfonodi che da un punto di vista molecolare sono risultati positivi per micrometastasi, appartenevano a 14 casi di carcinoma polmonare.

I casi, ristudiati sulla base dei risultati molecolari, sono stati così suddivisi: 3 casi sono passati da uno stadio N0 a uno stadio N1, 6 da uno stadio N0 a uno stadio N2 e 5 casi da uno stadio N1 a uno stadio N2.

Nei casi in cui l'analisi molecolare ha consentito una ristadiatione dei pazienti, si è evidenziata la tendenza dei pazienti all'insorgenza di precoci recidive e metastasi a distanza ed in un caso, il decesso del paziente.

SVILUPPI FUTURI

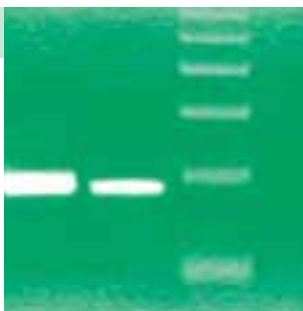
La possibilità di identificare precocemente le micrometastasi avrebbe un impatto clinico notevole: un miglior inquadramento prognostico dei pazienti ed una migliore definizione di strategie terapeutiche ottimali per subset di pazienti così identificati, tra cui anche quelli in stadio I che potrebbero trarre giovamento da trattamenti sistemici più aggressivi.

Con un periodo di follow-up adeguato dei pazienti sarebbe interessante valutare il significato prognostico di questo marcatore nella ricerca delle micrometastasi.

ALFA WASSERMANN

PROPONE PER LA QUALITA' IN BIOLOGIA MOLECOLARE

Controllo di seduta



RIPRODUCIBILITA'

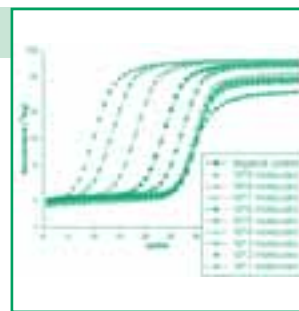
- Due diluizioni, una a basso ed una a medio titolo, consentono di tenere sotto controllo la sensibilità dei sistemi commerciali od "in house"

SICUREZZA

- Gli standard AlfaWassermann non sono infettanti in quanto cloni sintetici, non necessitano quindi di particolari misure di sicurezza sia per il trasporto che per l'utilizzatore nel corso della manipolazione

Cod.	Descrizione	DNA	RNA
05960213	HCVregione5'UTR-Q.C.-2vlsx12	X	
05960331	HIVregionegag -Q:C:-2vlsx12	X	
05960118	HBVgenomacompleto-Q.C.-2vlsx12	X	
05960477	CMVregioneimmed.early -Q.C.-2vlsx12	X	
05960478	EBVregioneBamHI-W-Q.C.2vlsx12	X	
05960479	HPV16genomacompleto -Q.C.-2vlsx12	X	
05960480	HPV18genomacompleto -Q.C.-2vlsx12	X	
05960566	M.tuberculosisIS6110-Q.C.-2vlsx12	X	
05960214	HCVregione5'UTRRNA-Q.C.-2vlsx12		X
05960481	SARSCoronavirusRNA-Q.C.-2vlsx12		X

Standard di calibrazione Real Time PCR



RIPRODUCIBILITA'

- Gli standard sono pronti all'uso e già aliquotati alle corrette diluizioni
- Gli standard sono aliquotati in volume sufficiente ad effettuare tre repliche per ciascun punto della curva

PRATICITA'

Ogni punto degli standard è facilmente identificabile da un codice colore per un miglior utilizzo pratico da parte dell'operatore

Ogni seduta può essere effettuata scongelando una singola serie di 4 diluizioni. Questo evita ogni rischio di shock termico alle altre serie di standard

Cod.	Descrizione	DNA	RNA
05960209	HCVregione5'UTR -Q.C.-4vlsx8	X	
05960329	HIVregionegag -Q:C:-4vlsx8	X	
05960116	HBVgenomacompleto-Q.C.-4vlsx8	X	
05960467	CMVregioneimmed.early -Q.C.-4vlsx8	X	
05960468	EBVregioneBamHI-W-Q.C.4vlsx8	X	
05960469	HPV16genomacompleto -Q.C.-4vlsx8	X	
05960470	HPV18genomacompleto -Q.C.-4vlsx8	X	
05960564	M.tuberculosisIS6110-Q.C.-4vlsx8x		
05960210	HCVregione5'UTRRNA-Q.C.-4vlsx8 x		X
05960471	SARSCoronavirusRNA-Q.C.-4vlsx8		X

ALFA WASSERMANN

Direzione Commerciale:
20126 Milano-Viale Sarca,223
Tel.02.64.222.1 - Fax 02.64.222.61
Sede Legale: 65020 Alanno Scalo (PE)
Contrada S.Emidio Tel.085.85.711-Fax 085.85.41.625

I prodotti di **BIOLOGIA MOLECOLARE**
sono prodotti in esclusiva per **ALFA WASSERMAN** da:



s.r.l.

20139 Milano - Via B.Quaranta, 57
Tel: +39 02 56814413
Fax: +39 02 56814515
Email: info@clonit.it -www.clonit.it

LA TECNOLOGIA DEI DNA MICROARRAYS

Clarissa Consolandi¹, Roberta Bordoni¹ Laura Biagiotti²

1. Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Tecnologie Biomediche (Segrate)

2. Università degli Studi di Milano – Clonit S.r.l. (Milano)

DNA MICROARRAYS TECHNOLOGY

Human Genome Project has provided the sequence of the whole genome. Thus revolutionizing the way to carry out biological and biomedical research as well as to develop and implement novel technologies to carry out analysis.

These are the basis for the post genomic era,

which aims to, not only, list genes and their functions, but also to understand how cell components and organisms work together. DNA microarrays are a valid instrument for such aim.

This technology is able to perform nucleic acids quantitative and qualitative analysis significantly reducing the area where the analysis is made.

An array is an orderly arrangement of samples. It provides a mean to match known and unknown DNA samples based on base-pairing rules and automating

the process of identifying the unknown. An experiment with a single DNA chip can provide researchers information on thousands of genes simultaneously.

This technology is a rapid method of gene sequencing and analysing and is rapidly becoming a central platform for functional genomics; it has been applied to gene discovery, gene expression, detection of mutation or polymorphism and gene mapping. Biochip technology plays an important role in pharmacogenomics and molecular diagnostics.

Grazie al Progetto Genoma Umano, oggi si conosce l'intera sequenza genomica dell'uomo. La ricerca biologica e biomedica, pertanto, sono in una fase di transizione caratterizzata da due principali fattori: l'aumento significativo del-

come lavorano insieme le varie componenti di cellule e organismi. Strumenti potenti e versatili a tale scopo sono i Microarrays, denominati anche DNA chips: essi permettono un'analisi qualitativa e quantitativa degli acidi nucleici (DNA ed RNA)

mediante una riduzione significativa delle dimensioni dell'area utilizzata per l'analisi. Sono superfici miniaturizzate costituite da supporti in vetro su cui viene

deposto roboticamente un insieme di sonde molecolari oligonucleotidiche o polinucleotidiche, in modo che l'identità di ciascuna specie molecolare sia definita dalla sua disposizione nello spazio.

L'allestimento di un microarray comporta diverse fasi sperimentali.

Migliaia di sequenze di geni differenti sono immobilizzate, in posizioni ben definite, su una superficie di vetro attivata chimicamente.

Il campione biologico da analizzare



l'informazione derivante dalle sequenze genomiche e lo sviluppo di nuove tecnologie per la loro analisi. E' in questo contesto che nasce e si sviluppa l'era post-genomica, il cui compito non si limita a fornire un elenco di geni e delle loro funzioni, ma si propone di comprendere

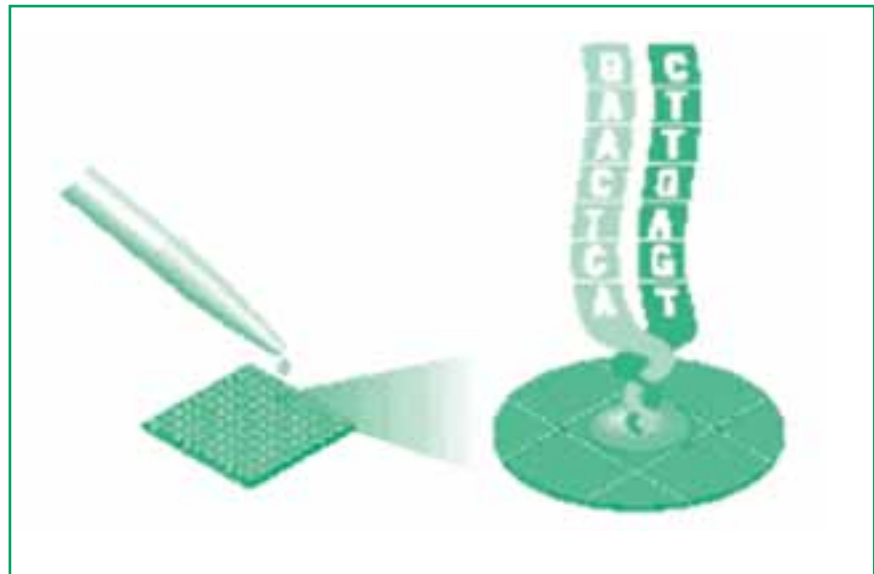


(DNA e/o RNA) viene marcato con molecole fluorescenti, in modo da essere successivamente rilevato mediante l'utilizzo di sistemi a scansione laser.

Il campione fluorescente viene applicato sul microarray. Se contiene una sequenza perfettamente complementare a quella adesiva al vetro, vi si lega.

La combinazione dell'informazione, derivante dal segnale fluorescente (da cui si desume l'avvenuto riconoscimento molecolare) con quella derivante dalla posizione spaziale (da cui si desume la sequenza del campione), permette di rivelare l'informazione genetica d'interesse.

I microarray sono fortemente competitivi rispetto ai tradizionali metodi della biologia molecolare: essi forniscono molte informazioni contemporaneamente e in tempi brevi, permettono di stabilire nuove funzioni geniche e danno un quadro più definito delle reti geniche.



Tra le loro numerose applicazioni, le principali riguardano l'analisi dell'espressione genica differenziale di migliaia di geni e lo studio delle variazioni di sequenza nel DNA genomico.

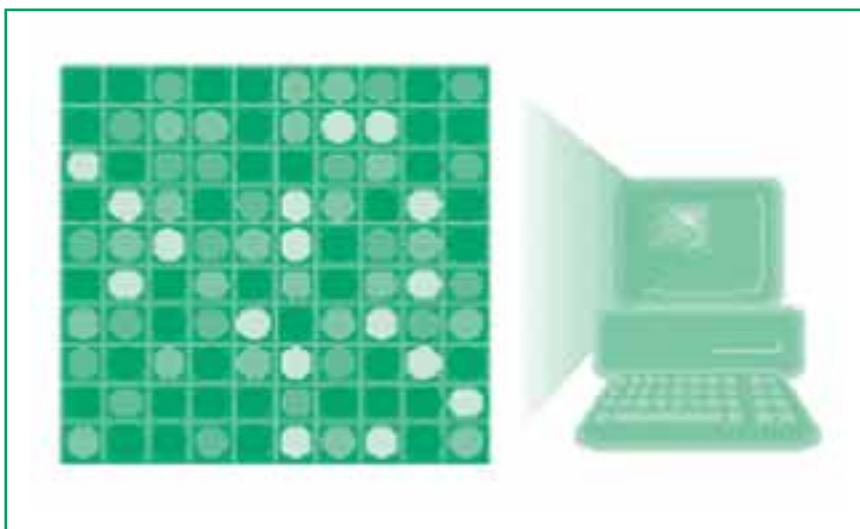
L'array d'espressione è utilizzato, prevalentemente, in ambito oncologico e farmacologico. Lo studio dei profili d'espressione ha portato ad una migliore conoscenza delle basi molecolari dello sviluppo di molti tipi di tumore, ad una nuova classificazione di alcuni istotipi tumorali, all'identificazione di nuovi marcatori utili per predire la prognosi e la risposta al trattamento terapeutico. In questo tipo di studi è possibile valutare le

differenze tra tessuti sani e malati oppure analizzare la cellula neoplastica nelle varie fasi del processo tumorigenico. Questa tecnologia consente, inoltre, di identificare nuovi bersagli farmacologici e di approfondire il loro meccanismo di azione a livello molecolare.

L'analisi delle variazioni di sequenza del DNA (mutazioni e polimorfismi) riveste un notevole interesse in campo diagnostico e terapeutico. Gli SNP (polimorfismi di un singolo nucleotide) rappresentano la forma di variazione di sequenza più frequente e possono essere utilizzati come marcatori molecolari per prevedere la suscettibilità genetica ad una malattia e per creare raggruppamenti di pazienti da sottoporre a studi clinici mirati.

Con il sequenziamento del genoma di molti patogeni, la tecnologia microarray si sta dimostrando un valido strumento anche per la rapida tipizzazione di microrganismi, per lo studio della loro fisiologia, delle interazioni con l'ospite e dei fattori di virulenza.

Grazie alle sue potenzialità, questa tecnologia risulta particolarmente flessibile e applicabile allo studio della maggior parte degli eventi biologici coinvolti in processi fisiologici e patologici.



PREANALITICA DEGLI ESAMI CLINICI DI BIOLOGIA MOLECOLARE

DR DAVIDE STANGALINI - SERVIZIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE - FLEMING RESEARCH ABBIATEGRASSO (MI)

ISTRUZIONI PER UNA RACCOLTA OTTIMALE DEGLI ESAMI DI BIOLOGIA MOLECOLARE.

1. Non utilizzare provette con eparina come anticoagulante.
2. Utilizzare provette e tappo sterili.
3. Centrifugare le provette senza togliere il tappo dalle provette.
4. Disinfettare la centrifuga almeno una volta alla settimana.

5. Togliere il siero o plasma dalle provette senza far gocciolare evitando di inquinare le provette adiacenti.
6. Mettere sangue, siero o plasma nelle provette senza sprizzare e partendo dal fondo della provetta.
7. Togliere i tappi delle provette a distanza di almeno 50 cm dalle rimanenti provette.
8. Inviare il materiale alla stessa temperatura di conservazione.

VIRUS	SIGLA	MATERIALE CONSIGLIATO
CITOMEGALOVIRUS	CMV DNA	sangue-EDTA, urine
CITOMEGALOVIRUS QUANTIZZAZIONE	CMV Q DNA	sangue-EDTA, urine
ENTEROVIRUS (Coxsackievirus A e B, Echovirus)	ENTEROV. DNA	sangue-EDTA, LCR
EPATITE B (regione S)	HBV DNA	Siero
EPATITE B (regione core)	HBV core DNA	Siero
EPATITE B QUANTIZZAZIONE	HBV Q DNA	Siero
EPATITE C	HCV RNA	Siero
EPATITE C QUANTIZZAZIONE	HCV Q RNA	Siero
EPATITE C TIPIZZAZIONE	HCV Tip RNA	Siero
EPATITE DELTA	HDV RNA	Siero
EPATITE G	HGV RNA	Siero
EPSTEIN BARR	EBV DNA	sangue-EDTA
EPSTEIN BARR QUANTIZZAZIONE	EBV Q DNA	sangue-EDTA
HERPES VIRUS	HSV DNA	sangue-EDTA, LCR
HERPES VIRUS tipizzazione I / II	HSV DNA	sangue-EDTA, LCR
HERPES ZOSTER (Varicella)	HZV DNA	sangue-EDTA, LCR
HIV-1 (gene env)	HIV DNA	sangue-EDTA
HIV-1 (gene gag)	HIV env DNA	sangue-EDTA
HIV-1 RNA QUANTIZZAZIONE (gene gag)	HIV Q DNA	plasma da sangue-EDTA + sangue-EDTA
HTLV-1	HIV Q DNA	sangue-EDTA
HTLV-2	HIV Q DNA	sangue-EDTA
PAPILLOMA VIRUS SCREENING	HPV DNA	materiale tissutale mirato
PAPILLOMA VIRUS TIPIZZAZIONE SEQUENZIAMENTO	HPV Tip DNA	materiale tissutale mirato
PARVOVIRUS B-19	PV B19 DNA	sangue-EDTA
POLIOVIRUS	POLIO DNA	LCR
POLIOMAVIRUS	JCV DNA	sangue-EDTA, LCR
RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS	RS DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
RUBELLA VIRUS	RV RNA	sangue-EDTA
BATTERI		
ANAEROBI PER PARODONTOPATIE	PAROD. DNA	coni di carta in fisiologica
BACILLUS ANTHRACIS	ANTRAX DNA	tamponi rino-faringei
BORDETELLA PERTUSSIS	BP DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
BORRELIA BURGDORFERI	BB DNA	sangue-EDTA, urine
BRUCELLA MELITENSIS DNA (biovar melitensis, abortus, suis)	BM DNA	sangue-EDTA
CHLAMYDIA PNEUMONIAE	CP DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
CHLAMYDIA TRACHOMATIS	CT DNA	tamponi vag.cervicali o uretrali, urine
HELICOBACTER PYLORI	HP DNA	biopsie, feci, saliva, , siero
HELICOBACTER PYLORI (gene CagA)	HP DNA	biopsie, feci, saliva, , siero
LEGIONELLA spp	Leg spp DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
LEGIONELLA pneumophyla	Leg p DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
LEGIONELLA TIPIZZAZIONE SEQUENZIAMENTO	Leg Tip DNA	espettorato, lav. broncoalveolare
LYSTERIA MONOCYTOGENES	LM DNA	secreto vaginale, LCR
MYCOBACTERIUM T. COMPLEX	MTB DNA	escreato, urine, lav. broncoalveolare
MYCOBACTERIUM spp	MTB spp DNA	escreato, urine, lav. broncoalveolare
MYCOBACTERIUM TIPIZZAZIONE SEQUENZIAMENTO	MTB T DNA	escreato, urine, lav. broncoalveolare
MYCOPLASMI E UREAPLASMI spp	MP DNA	Escreato
MYCOPLASMI E UREAPLASMI TIPIZZAZIONE SEQUENZIAMENTO	MP DNA	Escreato
MYCOPLASMA PNEUMONIAE	MP DNA	Escreato
SALMONELLA spp	SS DNA	feci
TREPONEMA PALLIDUM	TP DNA	tamponi vag. o uretrali
PROTOZOI - PARASSITI		
ENTAMOEBIA HYSTOLITICA	EH DNA	feci
GIARDIA LAMBLIA	GL DNA	feci
LEISHMANIA spp	LEISH DNA	sangue-EDTA
PLASMODIUM spp	Malaria DNA	sangue-EDTA
PLASMODIUM TIPIZZAZIONE (falciparum, vivax, malariae, ovalis)	Malaria Tip DNA	sangue-EDTA
TOXOPLASMA GONDII	TG DNA	sangue-EDTA, urine
FATTORI DI RISCHIO GENETICO		
APO E	APOE DNA	sangue-EDTA
EMOCROMATOSI (12 mutazioni)	EMOCR. DNA	sangue-EDTA
FATTORE II (Protrombina)	F II DNA	sangue-EDTA
FATTORE V Mutazione di Leiden	F V DNA	sangue-EDTA
MTHFR MUTAZIONE	MTHFR DNA	sangue-EDTA
MICRODELEZIONI CROMOSOMA Y (18 mutazioni in regioni AZF)	Cromos.Y DNA	sangue-EDTA
MUTAZIONE DEL FATTORE V DI LEIDEN	FATT.V DNA	sangue-EDTA
MUTAZIONE DEL FATTORE II	FATT.II DNA	sangue-EDTA
HLA B 27	HLA B27 DNA	sangue-EDTA
HLA DQ TIPIZZAZIONE	HLA DQ DNA	sangue-EDTA
HLA DR TIPIZZAZIONE	HLA DR DNA	sangue-EDTA
MALATTIE EREDITARIE		
FIBROSI CISTICA (31 mutazioni)	CF DNA	sangue-EDTA
ALFA-1-ANTITRIPSINA (genotip.-2 mutaz.)	a1-AT DNA	sangue-EDTA
b TALASSEMIA (7 mutazioni)	bTAL DNA	sangue-EDTA
IDENTIFICAZIONE PERSONALE DEL DNA	ESAME DNA	sangue-EDTA



MOLECULAR BIOTECHNOLOGY_{srl}

**RICERCA E SVILUPPO DI BIOTECNOLOGIE
NEL SETTORE ALIMENTARE E AMBIENTALE**

Laboratorio Analisi MBT

**ANALISI
ALIMENTI**

**ESAMI DI MICROBIOLOGIA
CON METODI CULTURALI
E DI
BIOLOGIA MOLECOLARE**

**ANALISI
AMBIENTALI**

**ARIA E SUPERFICI
IMPIANTI IDRICO-SANITARI
E DI CONDIZIONAMENTO
(LEGIONELLE spp)**

TOSSICOLOGIA

**TOSSINE BATTERICHE
MICOTOSSINE
DISINFETTANTI
PESTICIDI
SOSTANZE ORGANICHE**



Sede Legale Via Varese, 20
20121 MILANO
P.IVA 12508280158

Sede Operativa c/o Polo Scientifico e Tecnologico
Via Bovio, 6 28100 NOVARA
Tel.: 0321/697234 - FAX.: 0321/688270
E-mail: mbt@interfree.it - REA NO 198671





FLEMING RESEARCH S.R.L.

SEDE LEGALE

20122 MILANO
Viale Bianca Maria, 35
Tel. 02/76020693
Fax 02/76006126

SEDE AMMINISTRATIVA

20081 ABBIEGRASSO (MI)
Via San Carlo, 30
Tel. 02/94967163
Fax 02/94960386

www.fleming-research.it - email: info@fleming-research.it

LABORATORI ANALISI CLINICHE

- ▶ **ABBIEGRASSO (MI)** (PRIVATO) (ACCREDITATO)
Via San Carlo, 30 - Tel. 02/94967163 - Fax 02/94960386
Dir. Resp. Dr. STANGALINI Alberto - Biologo - Spec. Microbiologia Medica
Aut. Reg. DR/964/SAN.81 - Aut. Pubblicità Reg. 31873/93
- ▶ **NOVARA** (PRIVATO) (NON ACCREDITATO)
Viale Dante Alighieri, 43A - Tel. 0321/399181 - Fax 0321/33278
Dir. Resp. Dr. BELLOTTI Giuseppe - Biologo - Spec. Patologia Generale
Aut. Reg. DR 369/79 - Aut. Pubblicità DRG 290/3661 del 27/11/95
- PUNTO PRELIEVI**
▶ **ARONA (NO)** (PRIVATO) (NON ACCREDITATO)
Via Monte Pasubio, 32 - Tel. 0322/243369 - Fax 0322/248395
Aut. ASL N. 13 (N. 1201 del 28/04/1997)
- ▶ **MILANO** (PRIVATO) (NON ACCREDITATO)
Viale Bianca Maria, 35 - Tel. 02/76020693 - Fax 02/76006126
Dir. Resp. Dr. ROCCIO Carlo - Biologo - Spec. Endocrinologia Sperimentale
Aut. Reg. DR 2454/84 - Aut. Pubblicità Reg. 31873/93
- ▶ **TREZZANO S/N (MI)** (PRIVATO) (ACCREDITATO)
Via Curiel, 26 - Tel. 02/4451625 - Fax 02/4451625
Dir. Resp. Dr. MACCHETTA Elide - Biologo
Aut. Reg. DR 13810/582 del 29/05/2000
Aut. Pubblicità ASL N°1 - Prov. MI N° 124 del 14/11/2000
- ▶ **CORSICO (MI)** (PRIVATO) (ACCREDITATO)
Via Monti, 26 - Tel. 02/45103007 - Fax 02/45109472
Dir. Resp. Dr. STANGALINI Davide - Biologo Spec. Biochimica Clinica
Aut. Reg. DR 123 del 08/01/2002
- PUNTO PRELIEVI**
▶ **CESANO BOSCONI (MI)** (PRIVATO) (ACCREDITATO)
Via Milano, 21 - Tel. 02/4503645
Aut. Reg. DR 123 del 08/01/2002