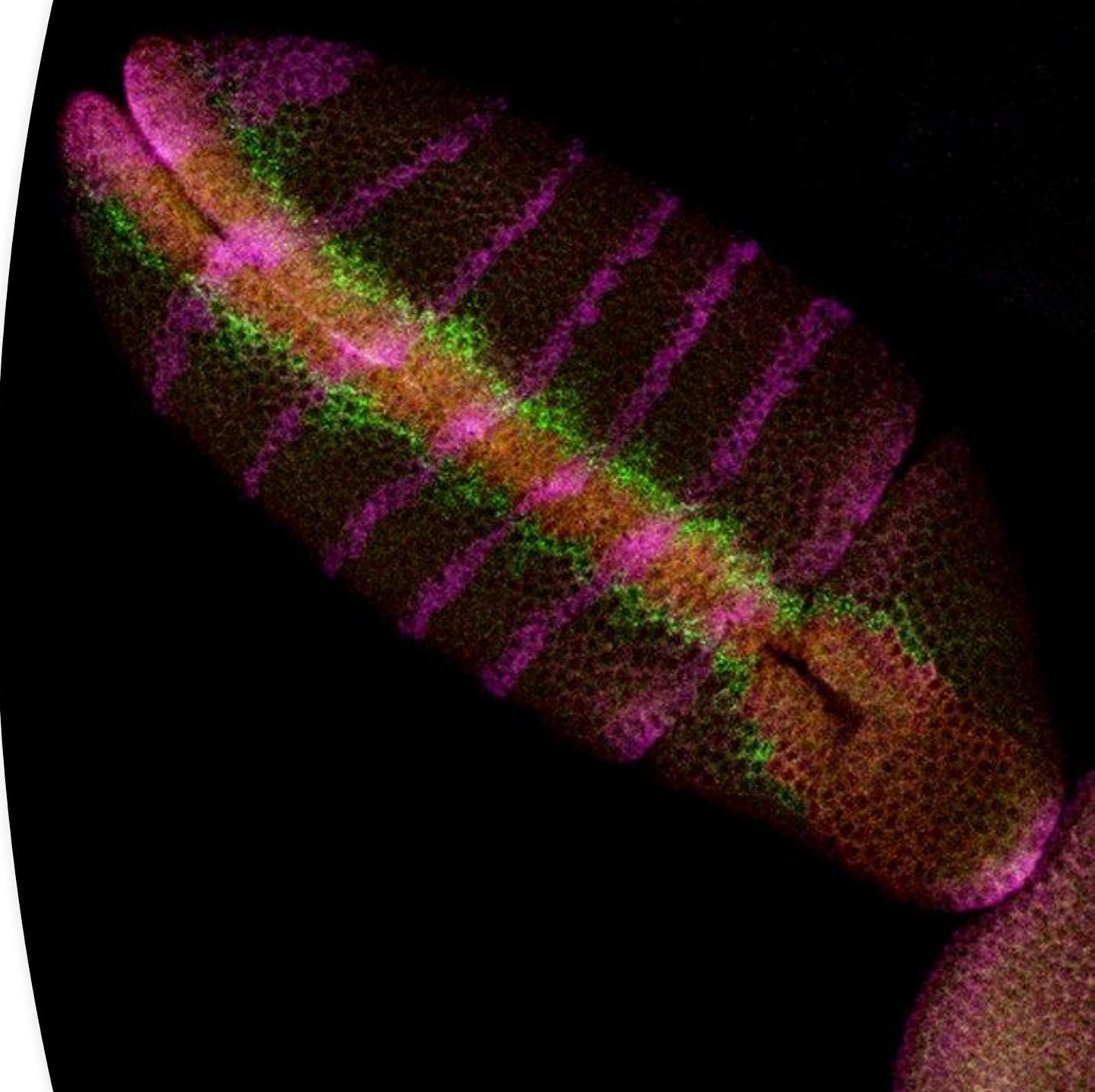

FISH

FLUORESCENCE
IN SITU
HYBRIDIZATION



FISH, FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

Si basa sulla capacità di appaiamento di molecole di acido nucleico a singolo filamento in base alla complementarietà delle basi

Con le tecniche di ibridazione è possibile identificare acidi nucleici presenti nel campione mediante uso di sequenze specifiche (probes) di appaiamento marcate

Cellule e tessuti su vetrino

Sample
Preparation

FISH
Protocol

Hybridization

Wash &
Counter Stain

Examine



Denature



75°C 5min



Humidified box
37°C 16 ~ 72 hrs



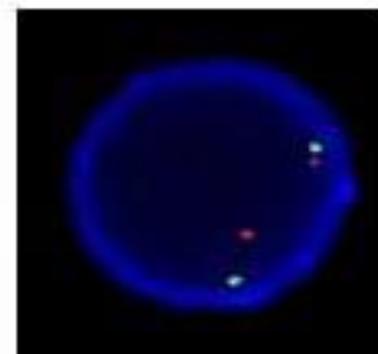
2X SSC
Room temp.
5 min

2X SSC
/0.3% NP-40
73~75°C
1-2 min

2X SSC
Room temp.
1 min

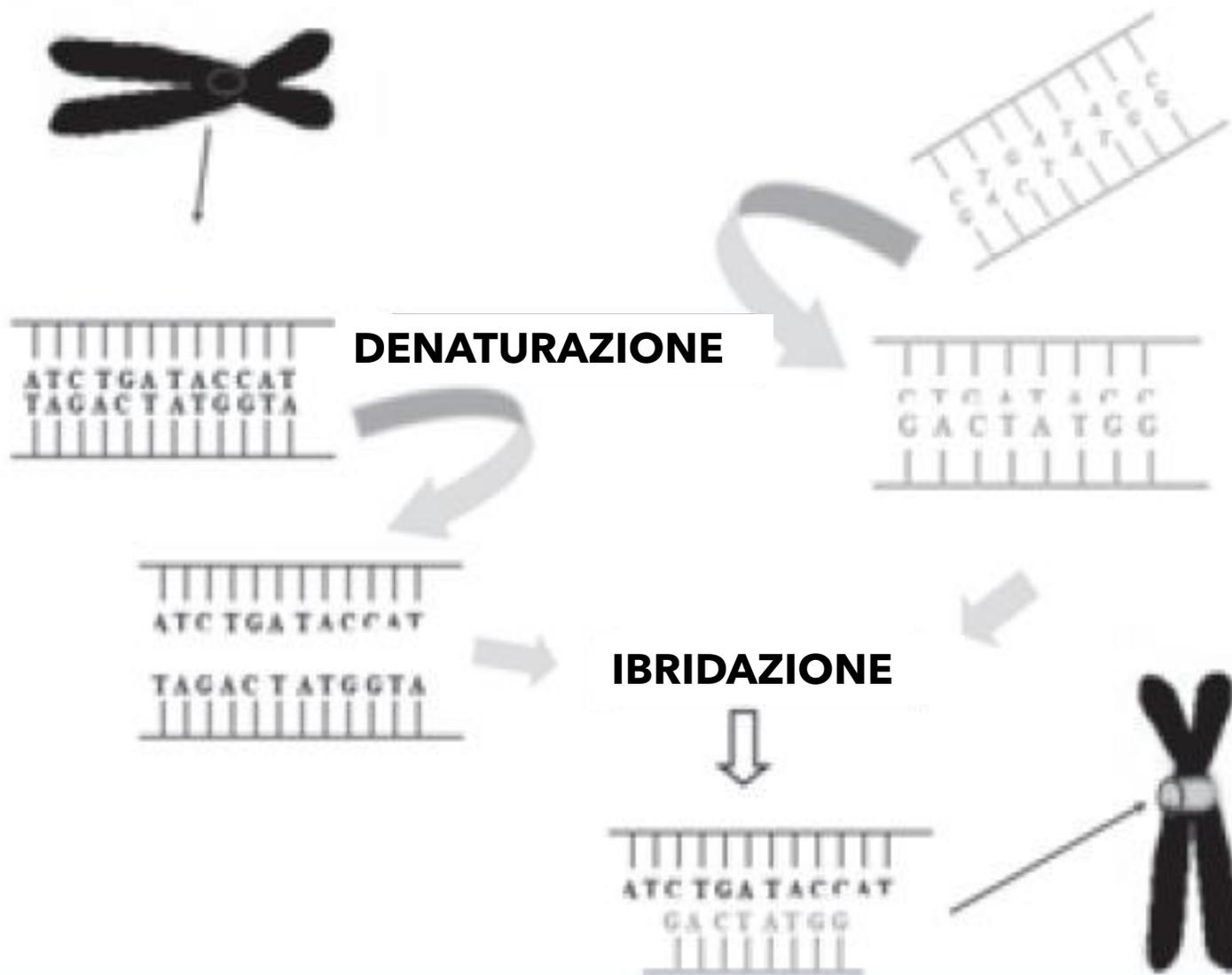


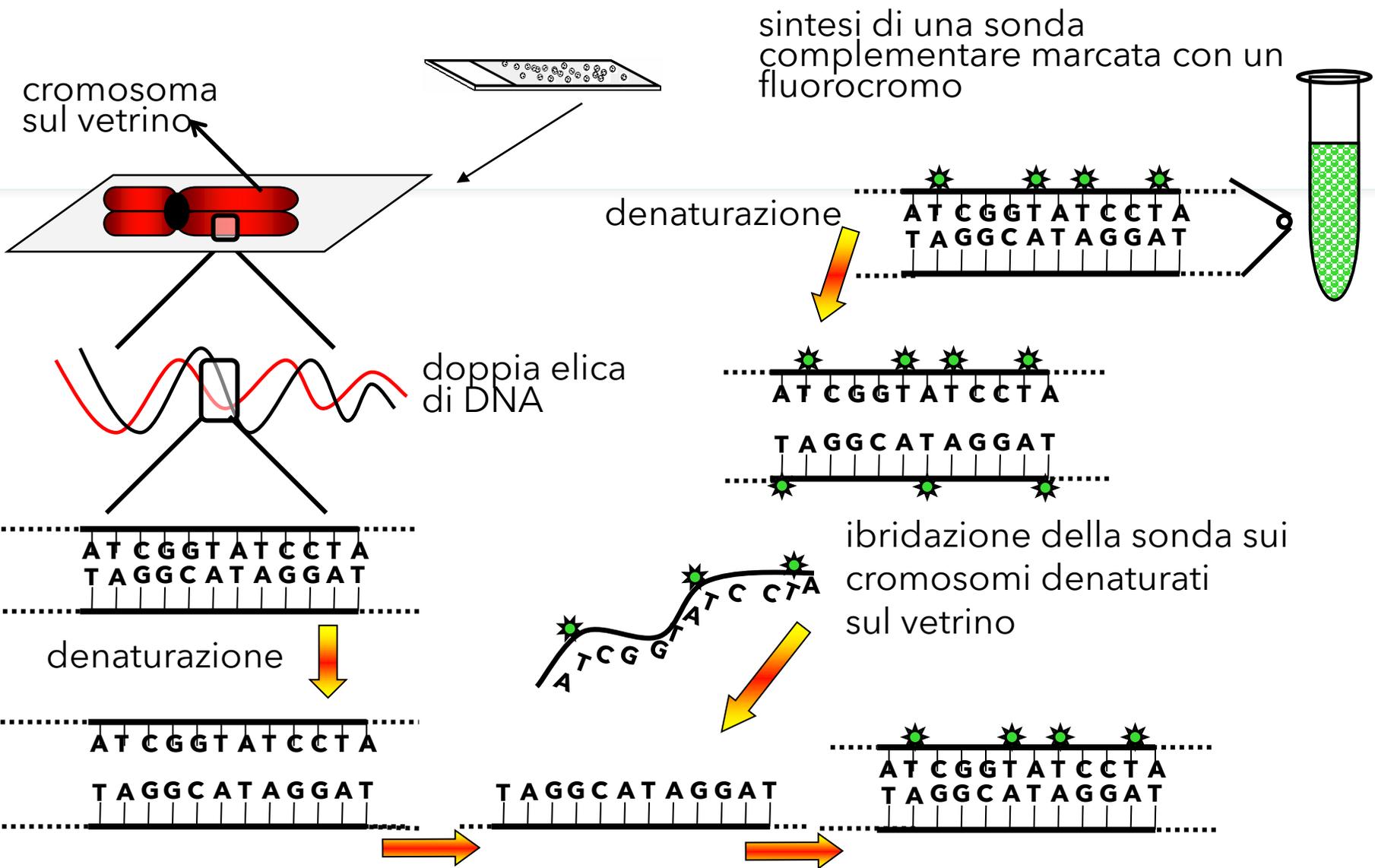
DAPI



cromosomi

probe di DNA





- Il grande vantaggio di questa tecnica è che la sequenza può essere vista **sia in metafase** che **in interfase**.
- Lo svantaggio è che si rileva solo la sequenza di interesse, senza fornire informazioni sul resto del genoma.
- La tecnica FISH è utile anche per rilevare traslocazioni in interfase.

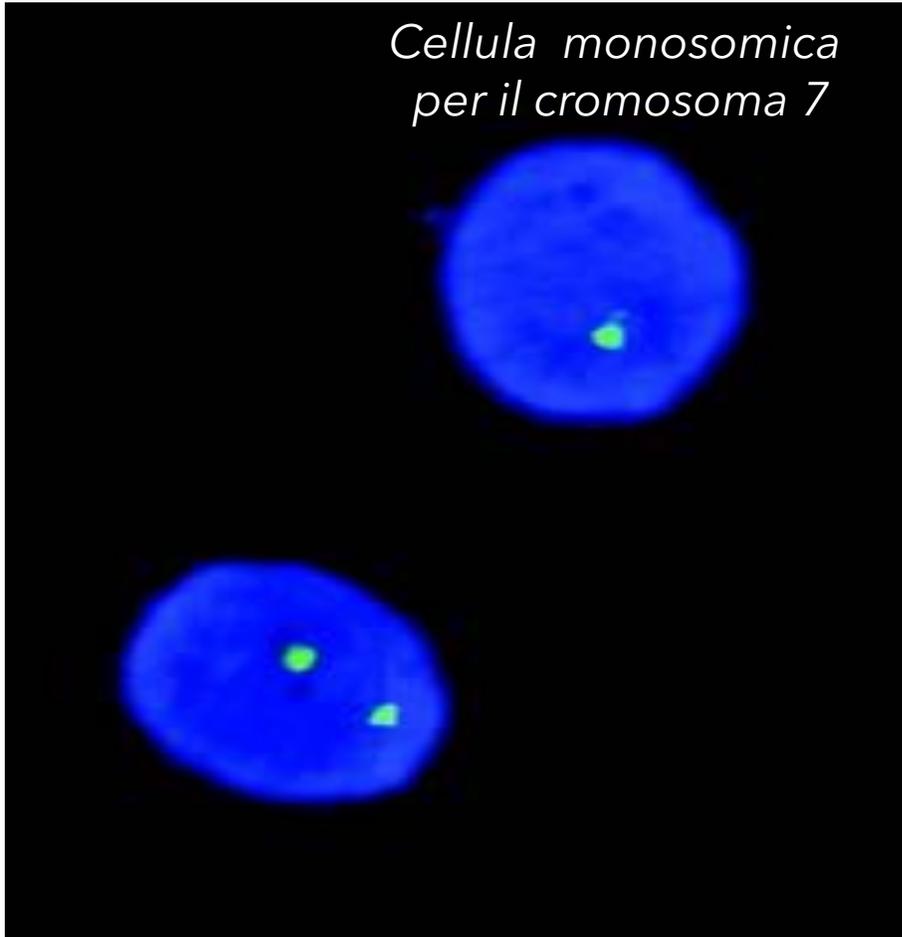
Possono essere utilizzate:

- sonde centromeriche (solo il marchio centromeri),
- sonde per interi cromosomi ('chromosome painting'),
- sonde a sequenza locus-specifica,
- sonde telomeriche e subtelomeriche (per contrassegnare regioni in prossimità del telomero).

FISH & CHROMOSOME PAINTING

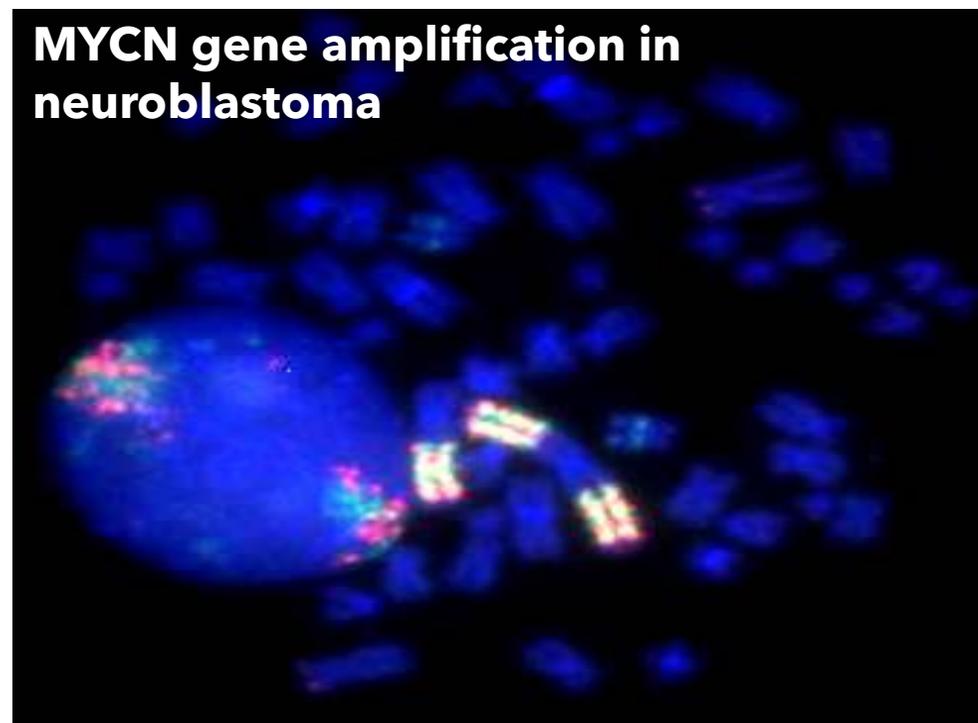
Sonda centromerica del cromosoma 7

*Cellula monosomica
per il cromosoma 7*

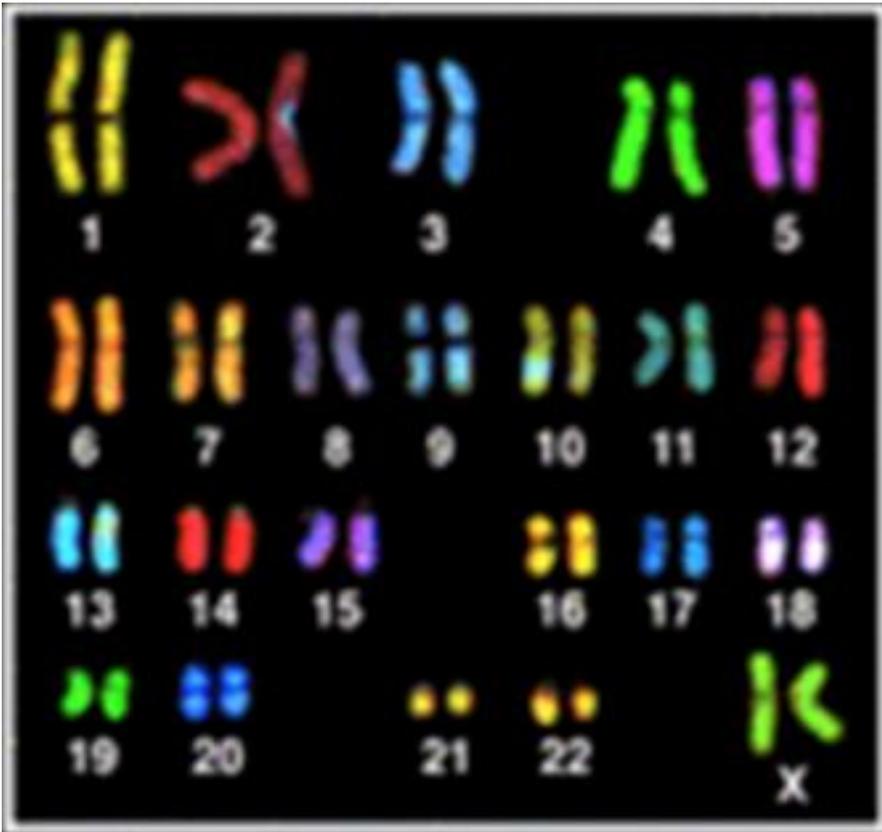


microdelezione e microduplicazione rilevate da sonde locus-specifiche

delezione 1p, Wolf-Hirschhorn, Cri du Chat, Sotos, Williams, Saethre Chotzen, CARICA, Langer Giedion, Pallister Killam, Prader Willi / Angelman, Rubinstein Taybi, Miller Decker, Smith Magenis, Di Giorgio / VCFS, la carenza di solfatasi steroidi, Cornelia de Lange, sindrome di Beckwith Wiedemann e di Charcot-Marie-Tooth.³



M-FISH

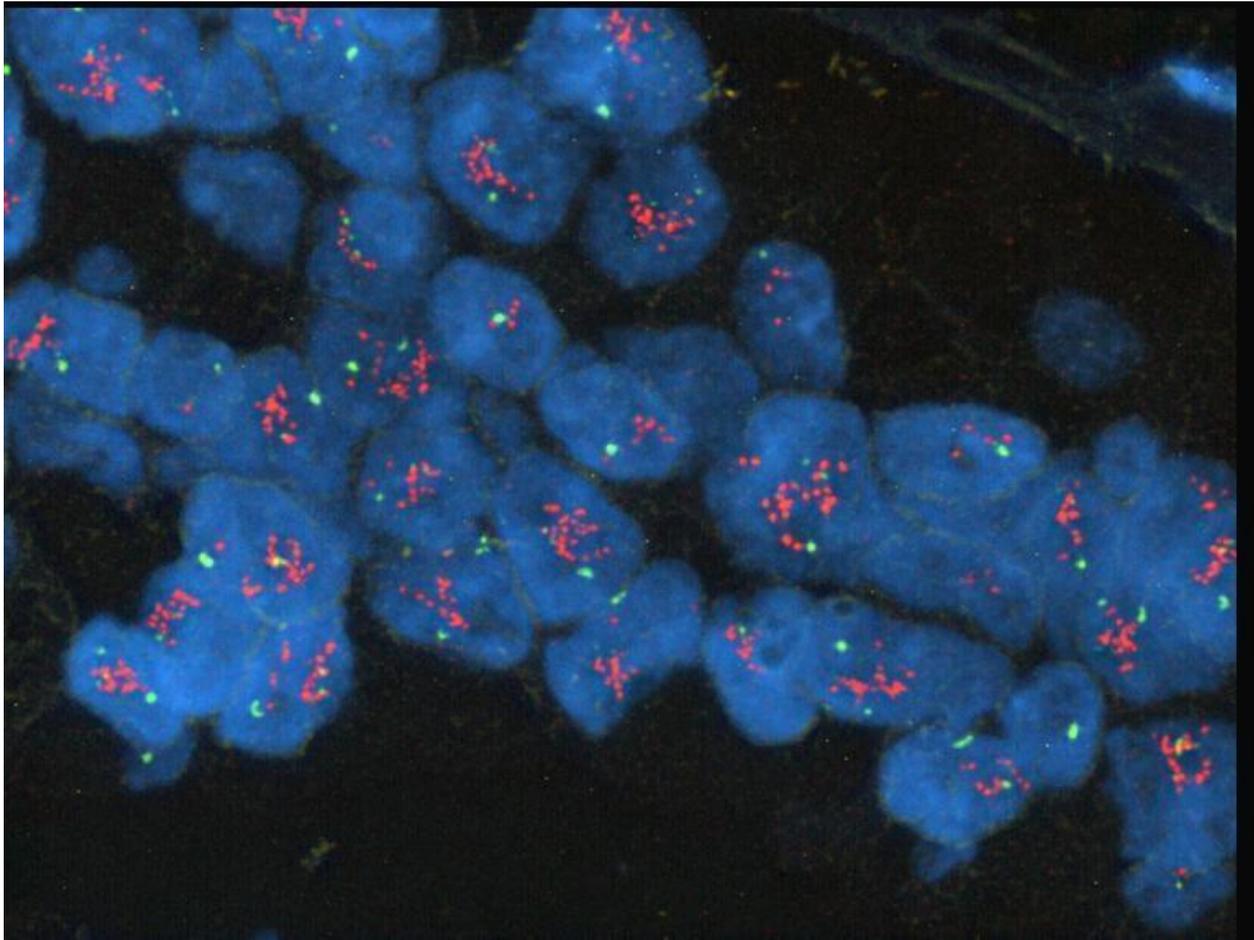


L'M-FISH (**Multicolor FISH**) e SKY (**Spectral Karyotype**) sono tecniche che permettono di visualizzare tutti i cromosomi, distinguibili per i colori diversi attribuiti ad ogni coppia, in un singolo test di ibridazione FISH di cromosomi in metafase con un cocktail di 24 sonde.

FISH in diagnostica

- Diagnostico, presenza o estensione di un tumore prima, durante e dopo terapia, diagnosi differenziale
- Prognostico, valutare aggressività biologica
- Predittivo, valutare probabilità di risposta ad una terapia
- Ricerca, nuove aneuploidie e riarrangiamenti oncologici

FISH carcinoma della mammella



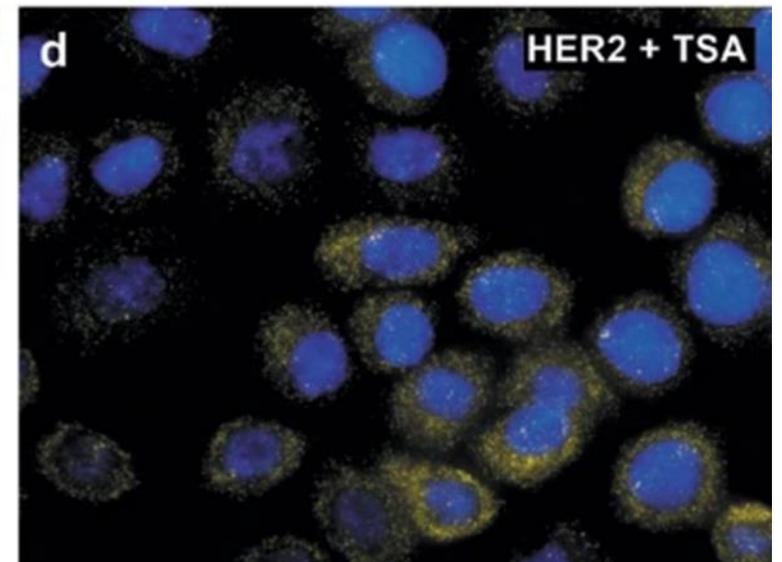
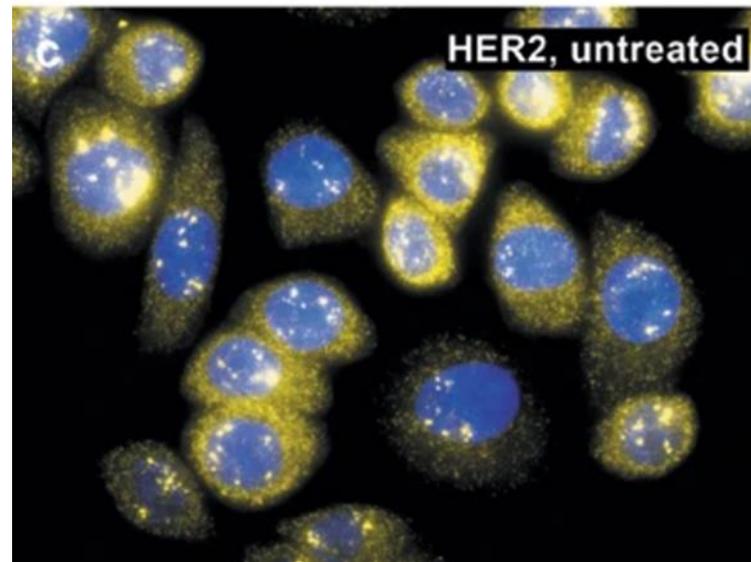
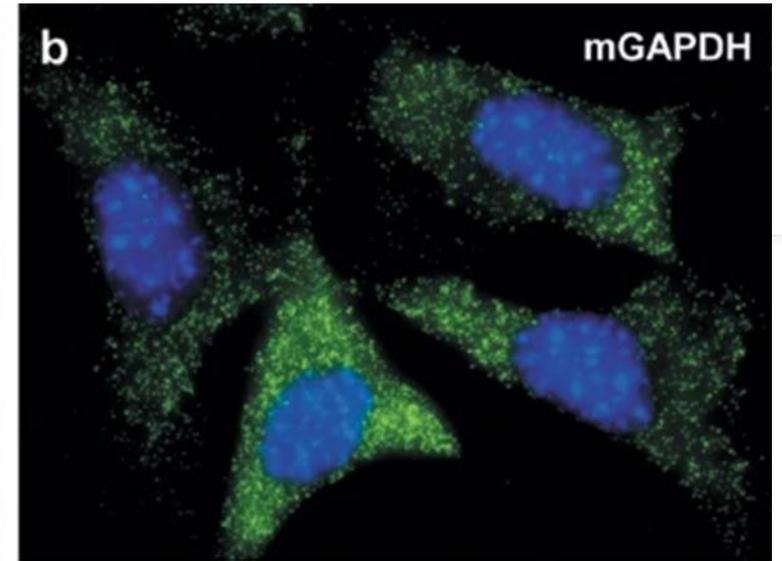
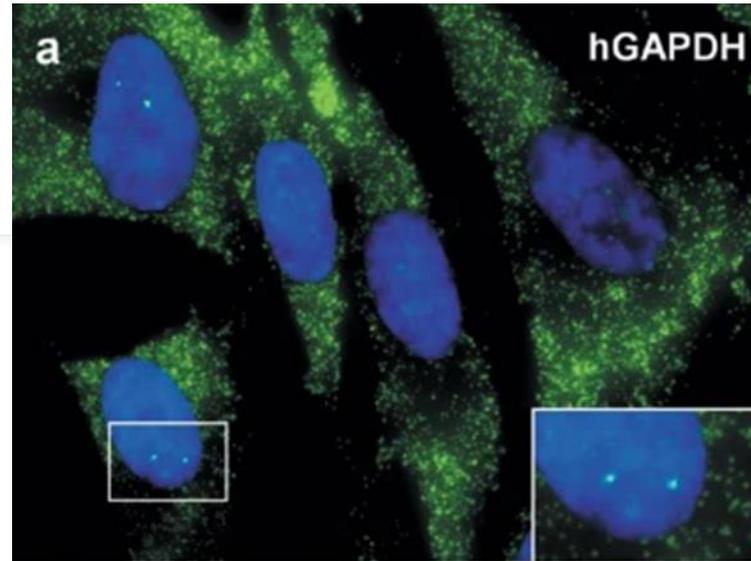
HER2/neu o CCND1

carcinomi mammari HER2 positivi

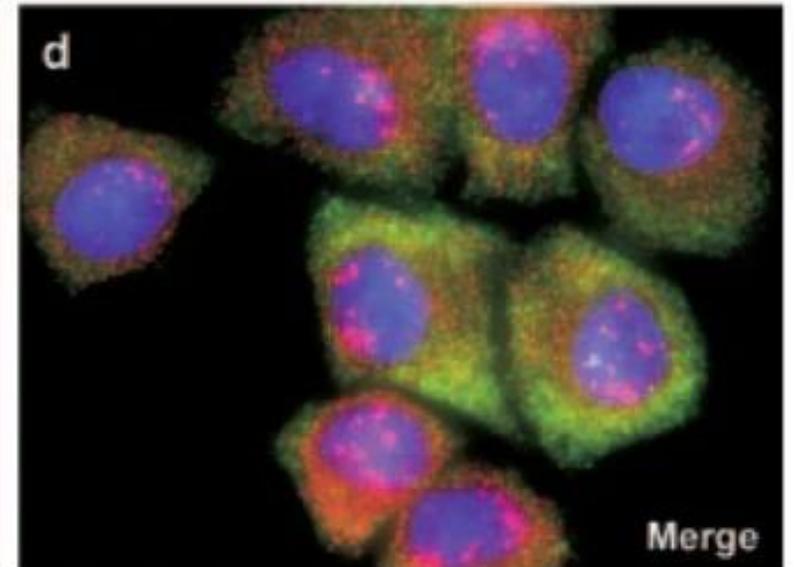
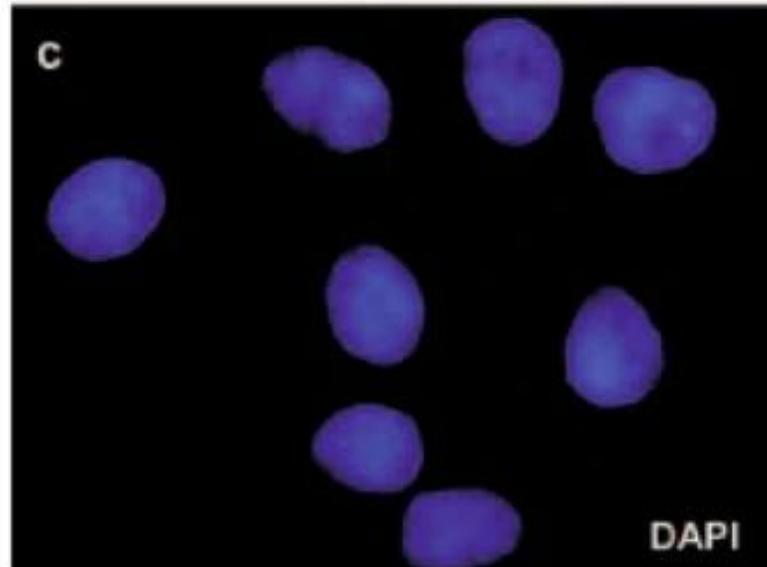
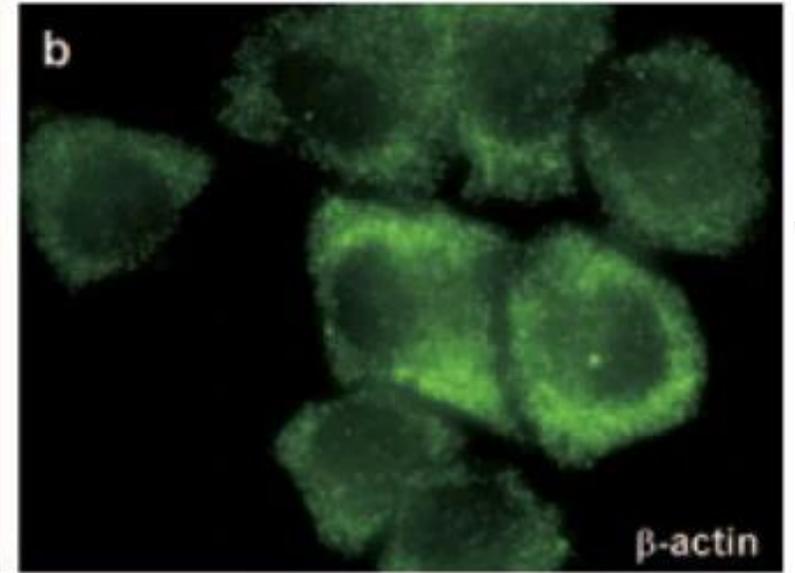
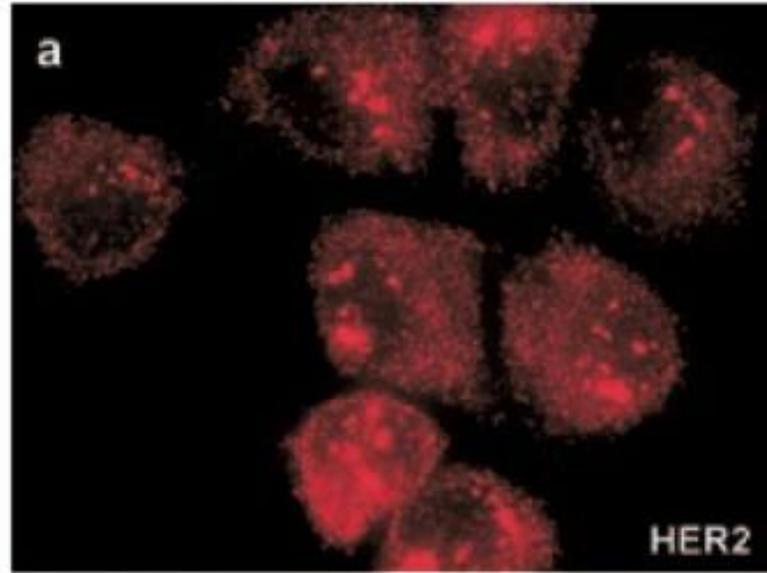
Scelta terapia farmacologica

Trastuzumab (Herceptin)

FISH mRNA



FISH mRNA



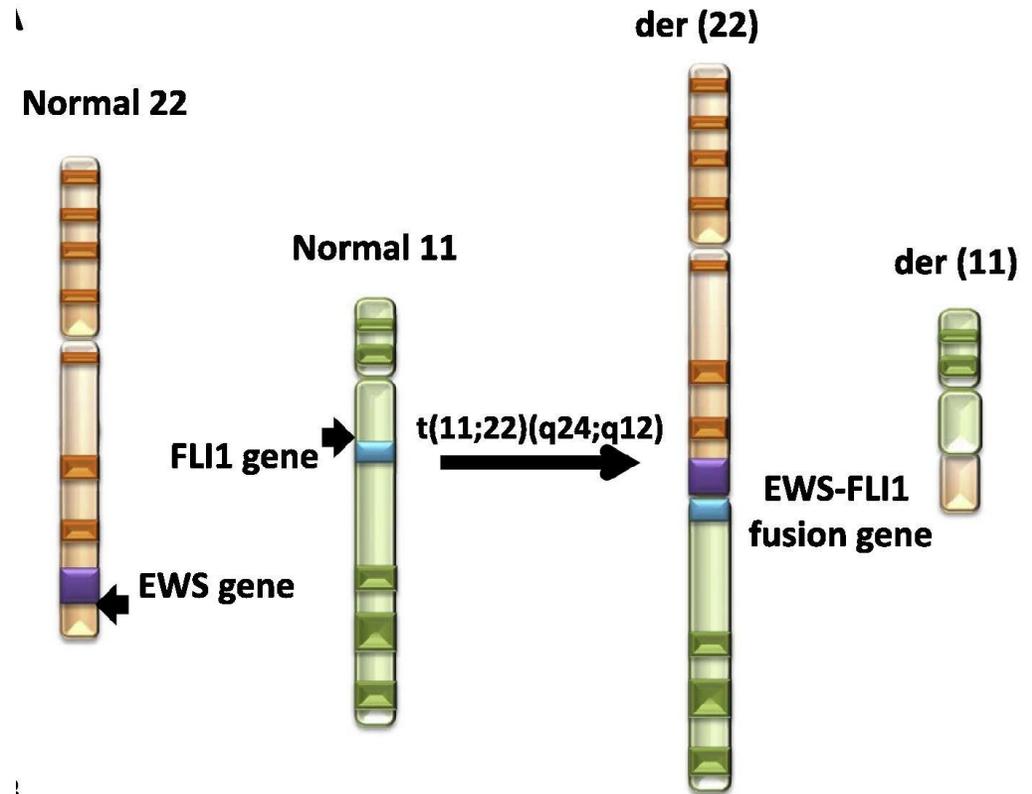
FISH sarcoma di Ewing

Tumori che originano da cellule staminali indifferenziate e colpiscono prevalentemente bambini e adolescenti

- Queste forme tumorali provengono da cellule staminali indifferenziate di **origine mesenchimale o neuroectodermica**, cioè da quei tessuti che, nell'embrione, danno origine al sistema **muscoloscheletrico e nervoso**.
- Sono state anche individuate alcune **mutazioni genetiche** nelle persone con tumori di Ewing e nell'**85 per cento** dei casi si tratta di modificazioni che coinvolgono i **cromosomi 11 e 22**.

FISH sarcoma di Ewing

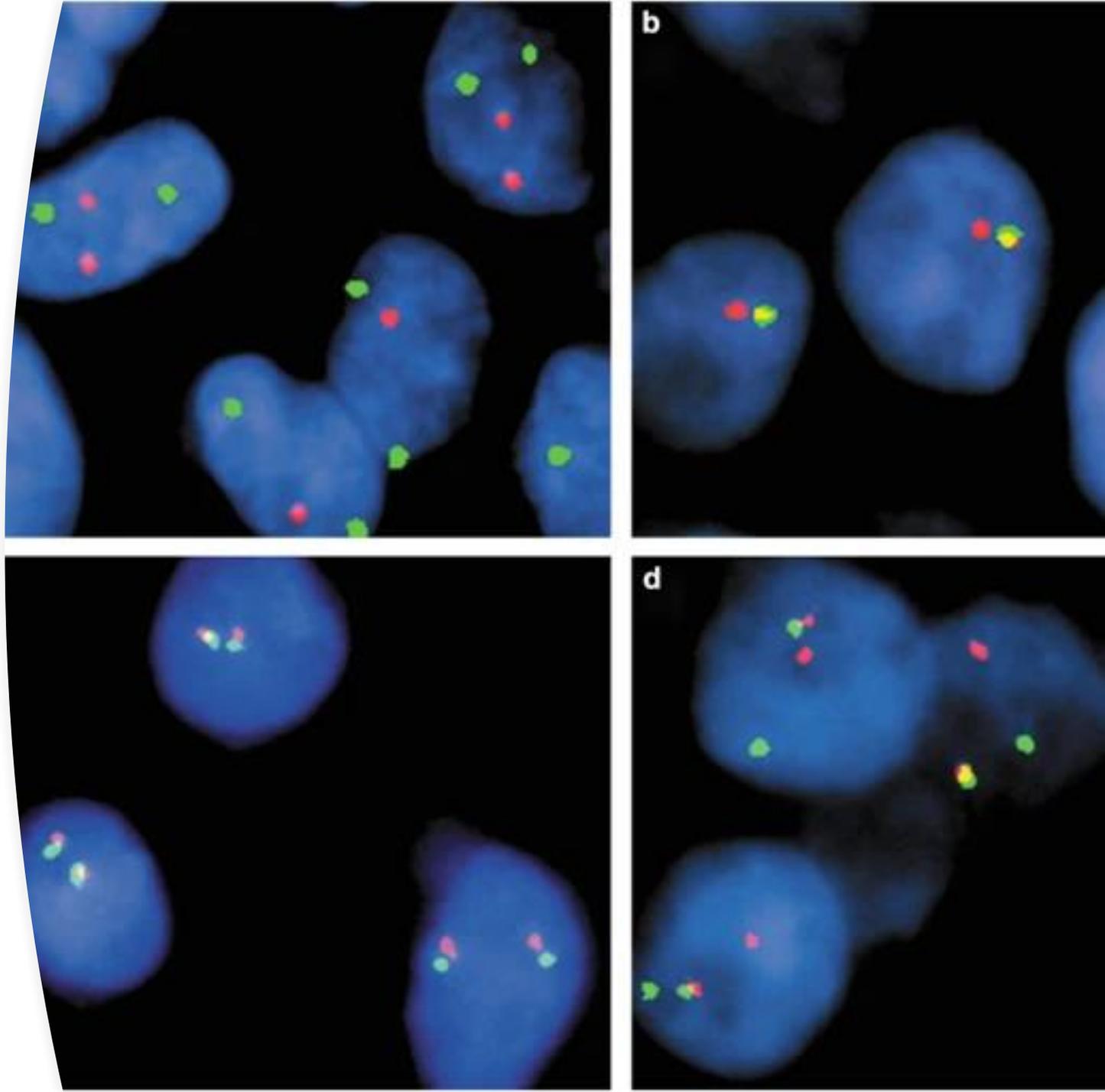
Queste **traslocazioni** portano il gene FLI del cromosoma 11 a posizionarsi vicino al gene EWS situato sul cromosoma 22. Il gene di fusione che ne deriva (EWS-FLI) è presente esclusivamente nelle cellule malate ed è il primo responsabile della malattia.

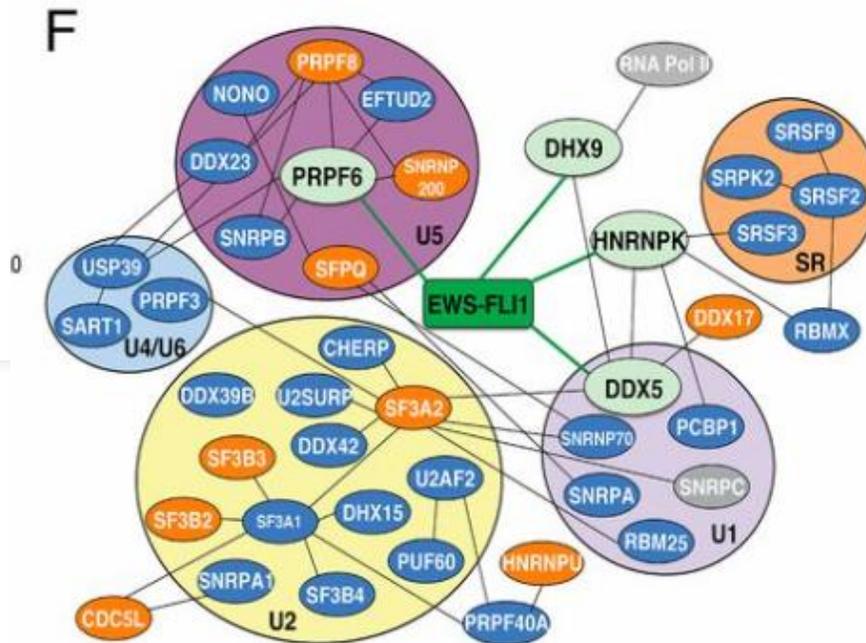
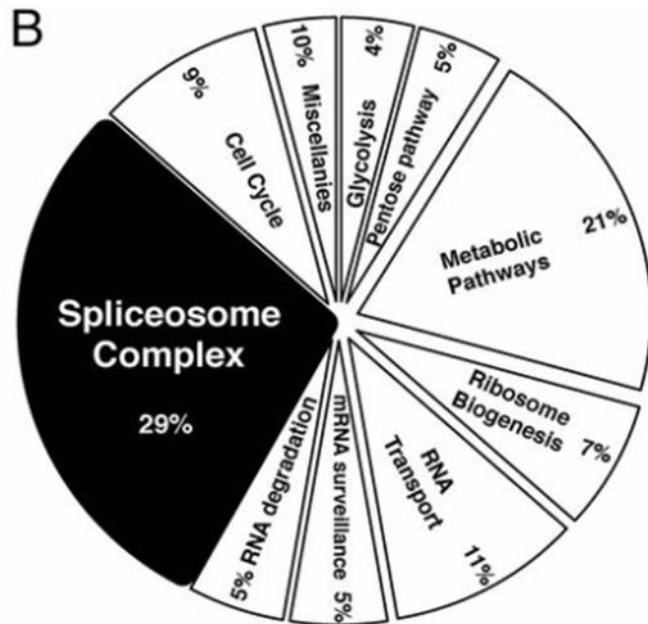
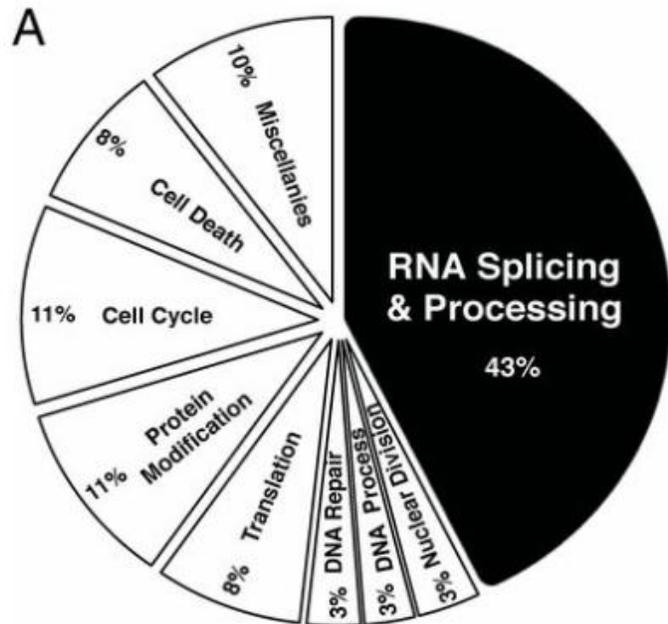


FISH sarcoma di Ewing

Caratteristica del sarcoma di Ewing è la presenza di traslocazioni cromosomiche che coinvolgono il braccio lungo del cromosoma 22.

La $t(11;22)(q24;q12)$ è stata la prima traslocazione associata ad un sarcoma ad essere stata caratterizzata a livello molecolare





EWS-FLI1-interacting proteins are highly enriched in RNA processing.

the key oncoprotein of Ewing sarcoma (ES), EWS-FLI1, regulates alternative splicing in multiple cell line models

sarcoma di Ewing diagnosi molecolare

Studio comparazione tra metodi di diagnosi Sarcoma Ewing FISH e RT-PCR

RT-PCR, identificare trascritto di fusione in gel d'agarosio e controllare mediante clonazione in costrutti e sequenziamento

FISH sezioni tessuto deparaffinate, permeabilizzate ed ibridate con sonda

ZytoLight® SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe



Background

The ZytoLight® SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe is designed to detect translocations involving the chromosomal region 22q12.2 harboring the EWSR1 (EWS RNA binding protein 1, a.k.a. EWS) gene.

Translocations involving the chromosomal region 22q12.2 are found in 90-95% of patients with Ewing sarcoma or peripheral primitive neuroectodermal tumors (PNET). Ewing sarcoma is the second most common, highly malignant bone tumor in children and young adults. The most frequent translocation involving the EWSR1 gene region is t(11;22)(q24.3;q12.2) juxtaposing the EWSR1 gene in 22q12.2 next to the FLI-1 (friend leukemia virus integration 1) locus in 11q24.3. FLI-1 is a member of the ETS family of transcription factors. Less frequently, EWSR1 can also be fused to ERG, a transcription factor closely related to FLI-1 but located in 21q22.2.

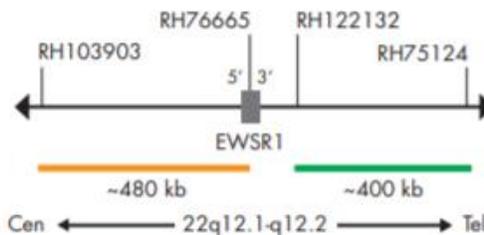
For prognosis and appropriate treatment

Probe Description

The SPEC EWSR1 Dual Color Break Apart Probe is a mixture of two direct labeled probes hybridizing to the 22q12.1-q12.2 band. The orange fluorochrome direct labeled probe hybridizes proximal and extends inward into intron 4 of the EWSR1 gene, the green fluorochrome direct labeled probe hybridizes distal to that gene.



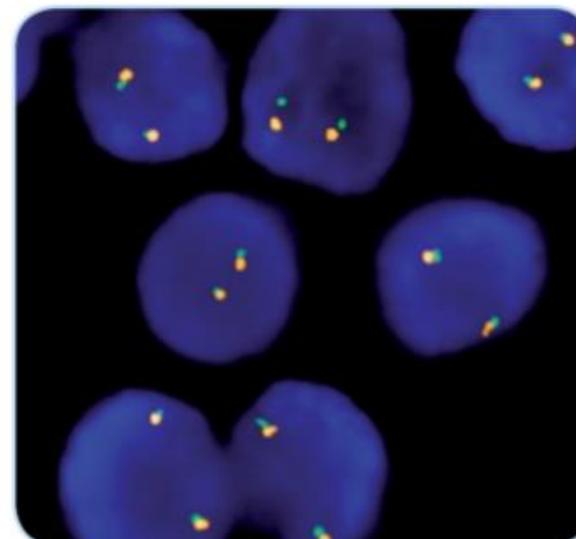
Ideogram of chromosome 22 indicating the hybridization locations.



SPEC EWSR1 Probe map (not to scale).

Results

In an interphase nucleus lacking a translocation involving the 22q12.1-q12.2 band two orange/green fusion signals are expected representing two normal (non-rearranged) 22q12.1-q12.2 loci. A signal pattern consisting of one orange/green fusion signal, one orange signal, and a separate green signal indicates one normal 22q12.1-q12.2 locus and one 22q12.1-q12.2 locus affected by a 22q12.1-q12.2 translocation.



FISH e Leucemia Mieloide Cronica

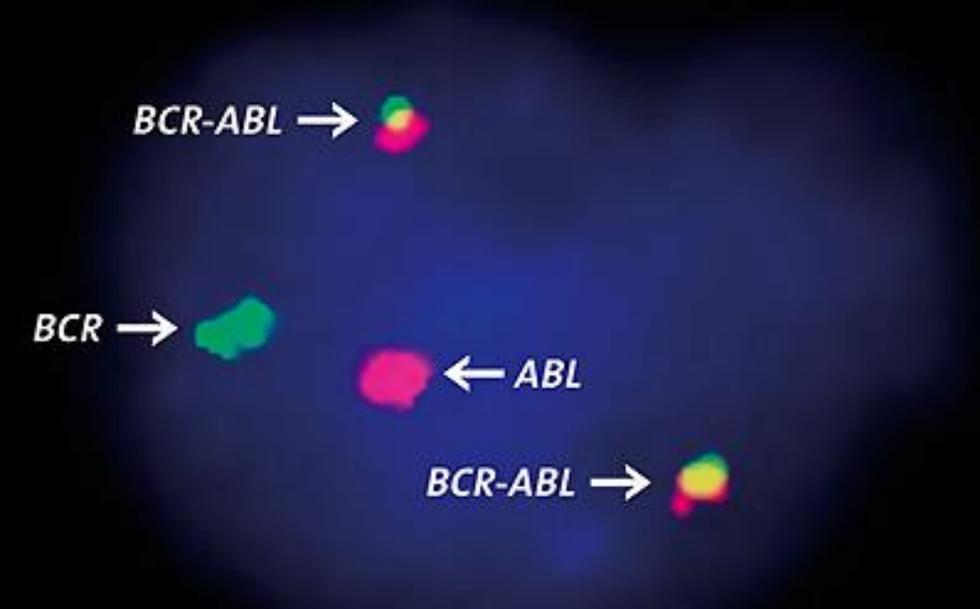
La LMC è stata la prima malattia neoplastica dell'uomo in cui una specifica anomalia del cariotipo, il cromosoma Philadelphia (Ph), sia stata associata alla insorgenza della leucemia.

Nel 95% dei casi di CML cromosoma non normale chr Philadelphia

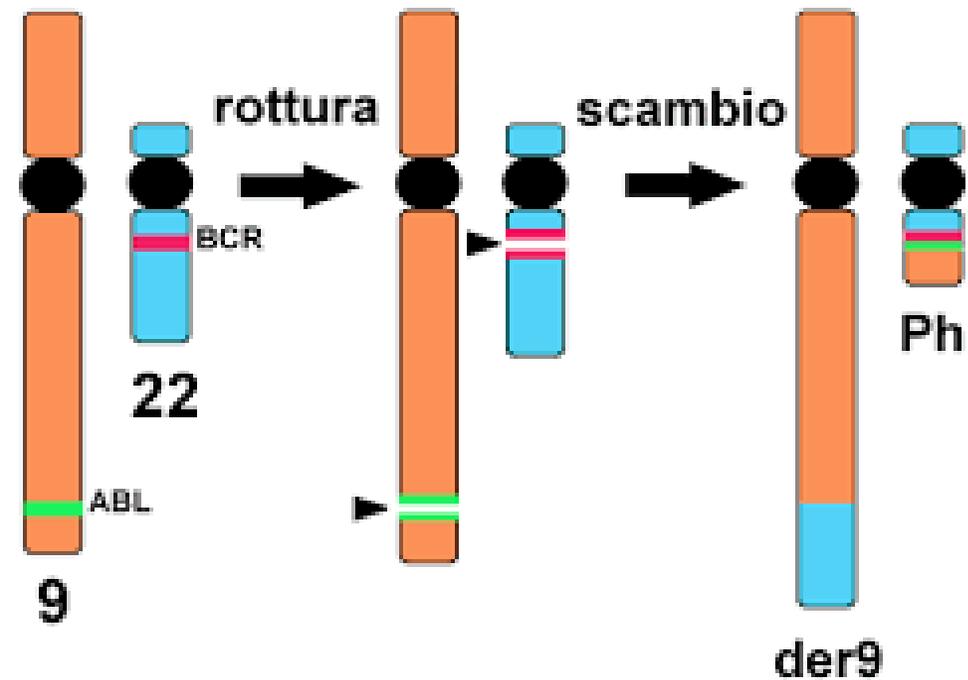
FISH- cromosoma Philadelphia

il gene di fusione **BCR-ABL** è un oncogene

- A seconda della posizione precisa della fusione il peso molecolare della proteina può variare tra **185-210 kDa**. Per questo motivo BCR-ABL è talvolta chiamato P210 o P185. Tre varianti clinicamente importanti sono le isoforme p190, p210 e P230.
- BCR e ABL sono due chinasi: **BCR** è una serina-treonina chinasi; **ABL** è una tirosina chinasi.
- Nel gene di fusione BCR-ABL: l'attività tirosina-chinasi di ABL è più elevata di quella di ABL wild-type con effetti sul ciclo cellulare



FISH- cromosoma Philadelphia

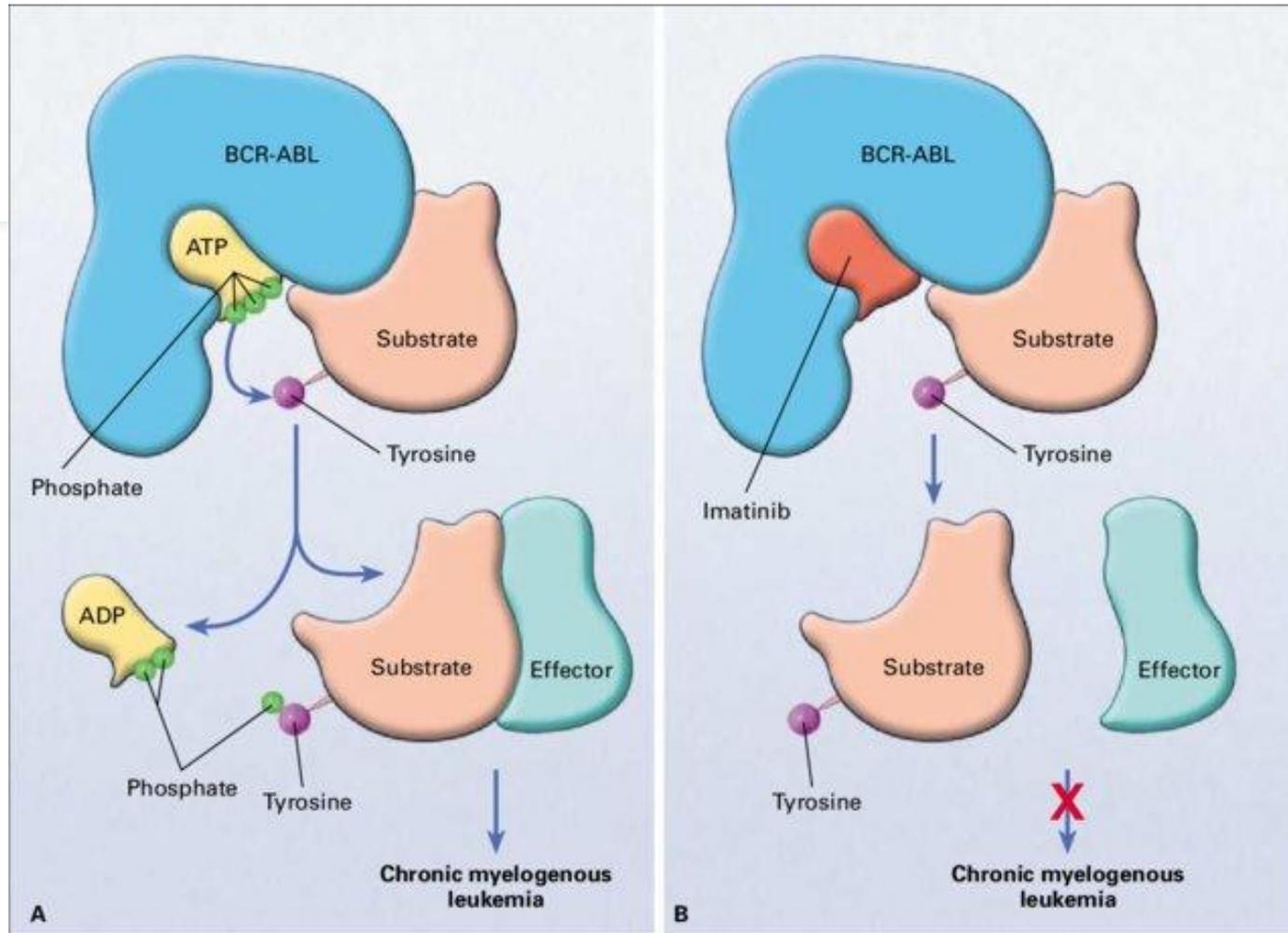


- Traslocazione reciproca braccio lungo chr.9 e il braccio lungo chr.22: t(9;22) (q34;q11)
- SI FORMANO DUE GENI DI FUSIONE:
 - **ABL-BCR su der9** (nessuna proteina prodotta)
 - **BCR-ABL su Ph** (proteina di fusione coinvolta nella proliferazione cellulare)

FISH- cromosoma Philadelphia

L'attività tirosin-chinasica del protooncogene Abl è regolata dalla regione che si trova all'estremità N-terminale della proteina. Nella **proteina ibrida BCR/ABL**, questa regione viene persa e viene sostituita dalla porzione N-terminale di BCR, che contiene un dominio di oligomerizzazione. Il risultato è l'attivazione incontrollata di BCR/ABL;

- Attività proliferativa incontrollata
- Blocco apoptosi
- Instabilità genomica



oncoproteina BCR-ABL
 con una molecola ATP
 nella tasca della chinasi
 attiva mediante
 fosforilazione su residuo di
 tirosina uno dei substrati
 attivando molecole effetrici
 a valle

Quando imatinib occupa la
 tasca della chinasi l'azione
 di BCR-ABL viene inibita,
 prevenendo la
 fosforilazione del suo
 substrato.

PCR e LMC

Nella fase di diagnosi eseguibile RT-PCR, l'RNA è isolato da midollo o sangue periferico, retrotrascritto in cDNA e amplificato mediante PCR usando primers specifici per le diverse regioni degli esoni di BCR e ABL.

Nella fase del monitoraggio della terapia viene eseguito la Real-time PCR

A close-up photograph of medical equipment on a document. In the foreground, a clear plastic syringe with a yellow plunger is positioned horizontally. To its right, a silver stethoscope is partially visible. The background is a white document with the word 'Diagnosi' printed in a large, bold, black font. Other text on the document includes 'Statistics' and 'ght:'.

Statistics

Casi
Diagnostici

Diagnosi

Carcinoma mammario



Diagnostica molecolare nel carcinoma mammario

- Tumore più diffuso tra le donne (30%)
- Neoplasia più frequente in Italia (14%)
- L'incidenza (numero di nuovi casi) è in leggera crescita soprattutto nelle donne più giovani, la mortalità è in diminuzione (una riduzione del 6% nel 2020 rispetto al 2015)

Diagnostica molecolare nel carcinoma mammario

- Fattori di rischio modificabili (obesità, alcool, fumo...)
- Fattori di rischio non modificabili (età e familiarità)
- 5-7% dei tumori mammari sono definiti ereditari, ovvero legati alla presenza di una mutazione trasmessa dai genitori in specifici geni
- mutazioni in BRCA1 e BRCA2 sono responsabili del 50% delle forme ereditarie di cancro del seno

Markers per la diagnostica del carcinoma mammario

Fattori predittivi e prognostici

Grandezza tumore e interessamento
linfoidale (markers clinico-patologici)

Indice proliferativo, ploidia, oncogeni
(markers molecolari)

Stadiazione istologica, sottotipo istologico
e status recettoriale per steroidi sessuali

SOTTOTIPI DI CARCINOMI

In seguito alle indagini di biologia molecolare sono stati individuati quattro sottotipi di carcinomi:

"Luminali A": espressione dei recettori ormonali (ER e PR), a prognosi favorevole;

"Luminali B": espressione dei recettori ormonali (ER e PR), con un rischio di recidiva elevato, a causa dell'elevato indice proliferativo correlato ad alta espressione dei geni di proliferazione;

"HER2": presenza di un over-espressione o amplificazione di HER2

"triple negative": assenza di espressione di recettori ormonali (ER, PR HER2) ma caratterizzati da una aumentata espressione delle citocheratine e spesso associato a mutazioni in BRCA, più difficile terapia

Markers per la diagnostica ed il trattamento del carcinoma mammario

- HR positivi: l'acronimo HR (da Hormon Receptor) ER+ PR+ 70% tumori della mammella
- modulatori selettivi dei recettori ormonali
- inibitori dell'aromatasi
- LHRH analoghi agonisti

Markers diagnostica del carcinoma mammario

- si effettua un esame istologico sul materiale prelevato nel corso di una biopsia o dell'intervento chirurgico, se i recettori sono effettivamente presenti, si dice che il tumore è positivo per i recettori degli estrogeni (ER+) e/o per quelli del progesterone (PR+)
- In tumori con profilo **recettoriale positivo** per estrogeni e progesterone la **terapia citostatica è sostituita da terapia endocrina**

Markers diagnostica del carcinoma mammario

- Il gene umano HER2 (noto anche come ERBB2 o NEU) è localizzato sul **cromosoma 17** e codifica la proteina indicata come HER2 o p185HER2. La proteina HER2 è **un recettore di transmembrana ad attività tirosin-chinasica con omologia per il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR o HER1)**
- Fattore crescita umano epidermide EGF lega recettori come HER2, stimolando la proliferazione di cellule neoplastiche.
- l'over-espressione o l'amplificazione del gene per il recettore HER-2 è stato riscontrato nel 20-30 % di pazienti con cancro della mammella e quindi classificate come sottotipo **HER-2 positive**

Markers diagnostica del carcinoma mammario

- **Il trastuzumab (Herceptin)** è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 che, legandosi selettivamente al subdominio IV extra-cellulare della proteina recettoriale HER-2, sarebbe in grado di esercitare effetti negativi sulla crescita di cellule tumorali

Markers diagnostica del carcinoma mammario

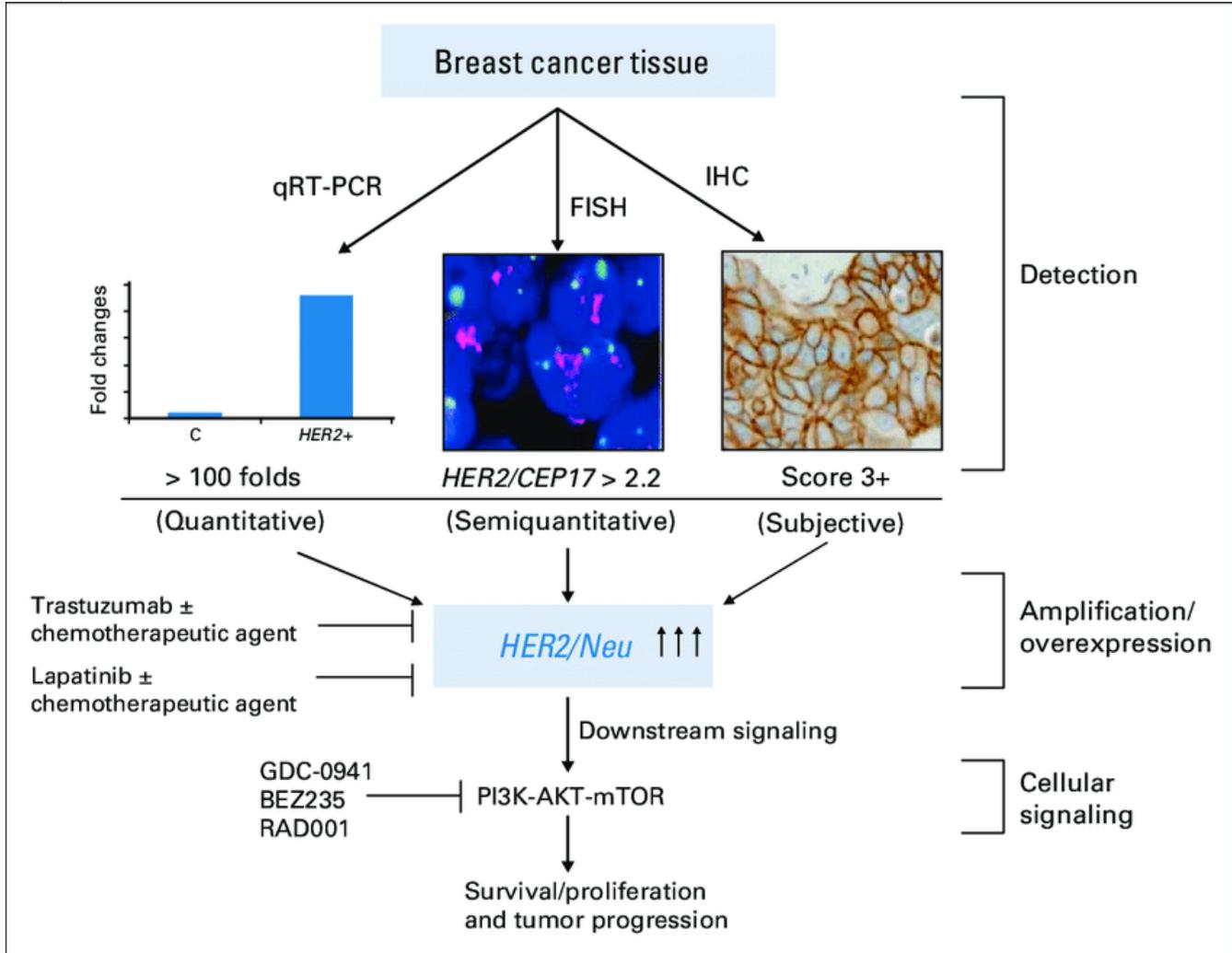
Il gene *BRCA1* è coinvolto nello sviluppo del tumore al seno e alle ovaie

Il ***BRCA1*** risulta essere implicato in una serie di funzioni cellulari di primaria importanza come la **riparazione del DNA**, la **regolazione della trascrizione**, il **controllo del ciclo cellulare** e l'**ubiquitinazione**

Nei soggetti portatori di questo tipo di mutazione il **rischio di sviluppare un carcinoma** mammario nell'arco della vita è compreso tra il 50 e l'70%; per il carcinoma ovarico il rischio è del 15-44%

Chemioterapia, PARP (poli ADP-ribosio polimerasi) inibitori, immunoterapia e chirurgia

Markers diagnostica del carcinoma mammario



Real time quantitative RT-PCR (**qRT-PCR**)

Immunohistochemistry (**IHC**)

FISH

PCR in situ

Markers diagnostica del carcinoma mammario

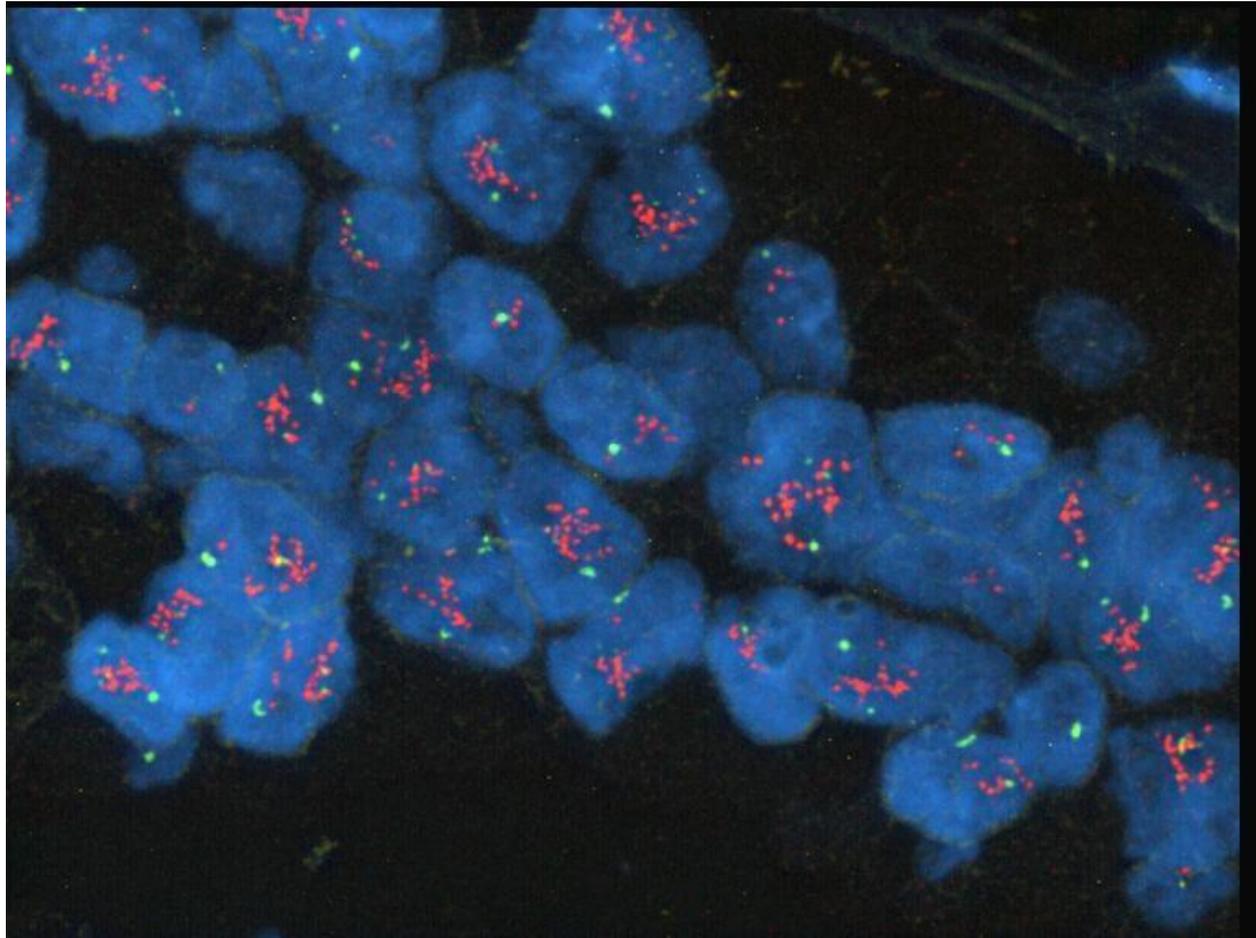
IHC, Real-time quantitative PCR

<i>IHC</i>	<i>Real-time PCR</i>	
	<i>Nonamplified (%)</i>	<i>Amplified (%)</i>
Negative	43 (79.6%)	0
Positive	3 (5.6%)	8 (14.8%)

Diagnostica molecolare carcinoma mammario

<i>Oligonucleotide</i>	<i>Conc.</i>	<i>Sequence</i>
HER2 forward	5	5'-CCA GGA CCT GCT GAA CTG GT-3'
HER2 reverse	5	5'-TGT ACG AGC CGC ACA TCC -3'
HER2 probe	5	5' HEX CAG ATT GCC ZEN AAG GGG ATG AGC TAC CTG 3' ABkFQ
RNaseP forward	2.5	5'- AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'
RNaseP reverse	2.5	5'- GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'
RNaseP probe	2.5	5' 6-FAM TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG 3' 6-TAMSp

FISH carcinoma della mammella



HER2/neu o CCND1

carcinomi mammari HER2 positivi

Scelta terapia farmacologica

Trastuzumab (Herceptin)

Diagnostica molecolare nella microbiologia clinica

- Dagli anni 70 agli inizi del 2000 sono stati identificati almeno 30 nuovi patogeni
- Agenti infettivi nuovi o emergenti per impatto dell'antropizzazione e per le condizioni igienico-sanitarie precarie in alcuni paesi
- Nel mondo si calcolano 22 milioni di morti di HIV e 36 milioni di persone attualmente infette
- In Italia all'inizio dell'epidemia, nel 1982, a oggi sono stati segnalati 71.591 casi di AIDS, di cui oltre 46 mila deceduti fino al 2018.

Diagnostica molecolare in microbiologia

- Ricerca diretta microrganismo
- Quantificare la carica microbica
- Identificare sottotipi
- Resistenze dei microrganismi ai farmaci
- Fattori virulenza
- Tossine prodotte
- Screening emotrasfusioni

Diagnostica molecolare in microbiologia

Consente di effettuare una sorveglianza ed un precoce riconoscimento degli agenti infettivi con rapidità ed accuratezza superiore ad i metodi microbiologici tradizionali (esame colturale, esame diretto al microscopio, immunodosaggi sierologici)

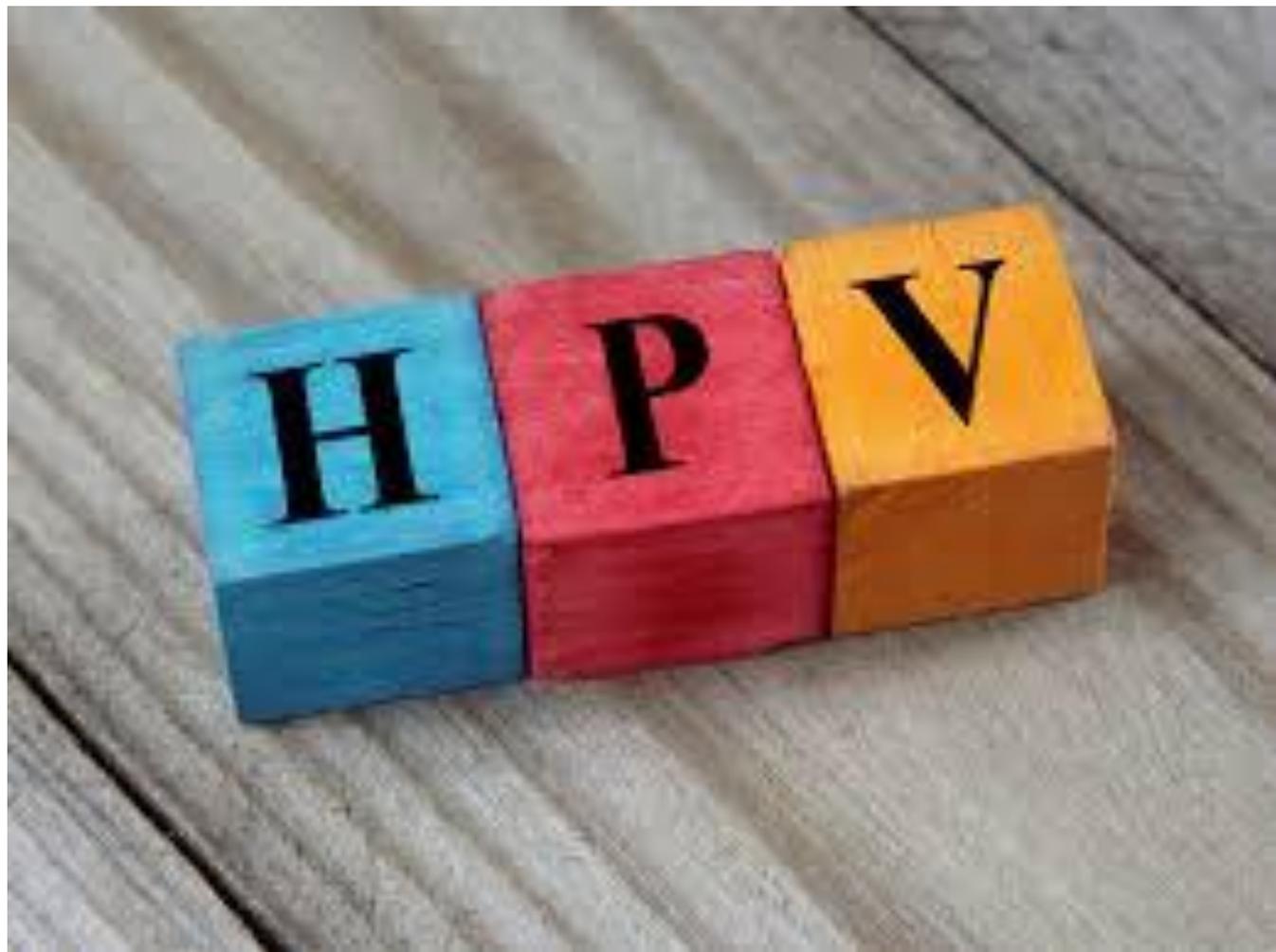
Identificare un microrganismo in base ad una o più sequenze geniche specifiche, con alto gradi di sensibilità e specificità, con tempi ridotti, ridotto rischio operatore e standardizzazione

Competenze tecniche, capacità di interpretazione dei dati, apparecchiature e test più costosi

Diagnostica molecolare in microbiologia

Tipizzazione di microrganismi

- Analisi della sequenza di regioni altamente conservate nei microrganismi (rRNA16S e/o 23S) o di importanza dal punto di vista infettivologico (spike)
- RT-PCR, nested-PCR, Real-Time PCR, PCR-competitive



Human Papilloma Virus (HPV)

Famiglia composta da oltre cento **varietà** diverse di **virus a DNA**

La maggior parte degli HPV causa lesioni benigne, come le verruche che colpiscono la cute (di mani, piedi o viso) e i condilomi o papillomi che interessano le mucose genitali e orali. La maggior parte delle infezioni genitali da HPV regredisce spontaneamente. Una piccola quota invece, se non trattata, può evolvere lentamente verso una forma tumorale. Il tumore del collo dell'utero è infatti quasi sempre correlato alla presenza dell'HPV.

Human Papilloma Virus (HPV)

HPVs che infettano la cervice uterina sono stati suddivisi in

- "a basso rischio" (6, 11, 42, 43, 44 ecc.) quasi mai associati a carcinomi invasivi della cervice
- "a medio rischio" (35, 39, 51, 56, 59 ecc.) associati, ma non di frequenti, con il carcinoma della cervice
- "ad alto rischio" (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 ecc.)
frequentemente associati ai carcinomi

Human Papilloma Virus (HPV)

- I Papillomavirus umani non possono essere coltivati in vitro per la diagnostica, in quanto si moltiplicano solo in cheratinociti differenziati, né sono disponibili saggi sierologici affidabili per identificare infezioni in atto
- Prelievo materiale citologico per valutazione morfologica microscopica. Questo tipo di prelievo permette ulteriori analisi con il sedimento residuo
 - Reazioni di immunocitochimica
 - Analisi molecolari

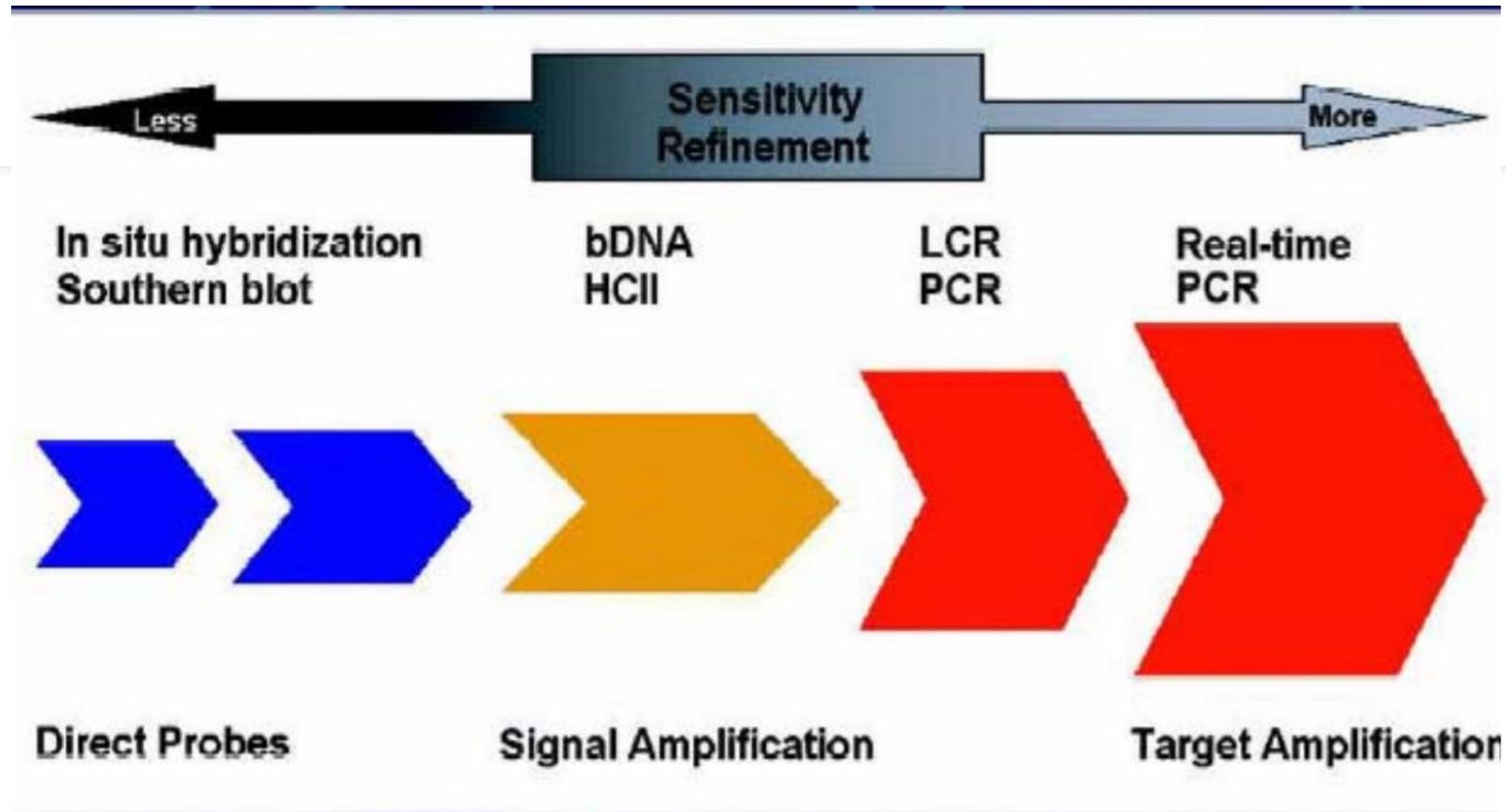
Human Papilloma Virus (HPV)

Analisi con tecniche immunocitochimiche

Prevedono l'uso di Ab monoclonali o policlonali per la ricerca di **Ag presenti sul capsido virale** eseguita sia su sezioni bioptiche che su materiale citologico fresco o fissato. I limiti di questa metodica presenta una sensibilità non ottimale (ad es. nei casi in cui gli Ag del capsido non sono espressi)

Analisi con tecniche di amplificazione molecolari

Human Papilloma Virus (HPV)



Tipizzazione tipo-specifica nelle infezioni persistenti nel follow-up delle lesioni trattate; Studi epidemiologici; Studi vaccini

Human Papilloma Virus (HPV)

- Mappaggio genotipico del virus HPV e EBV in lesioni cervice uterina
- Tipizzazione ceppo virale che sostiene infezione fondamentale ed affidata a tecniche di biologia molecolare dove sensibilità è tra 95-98%

Test diagnostici HPV

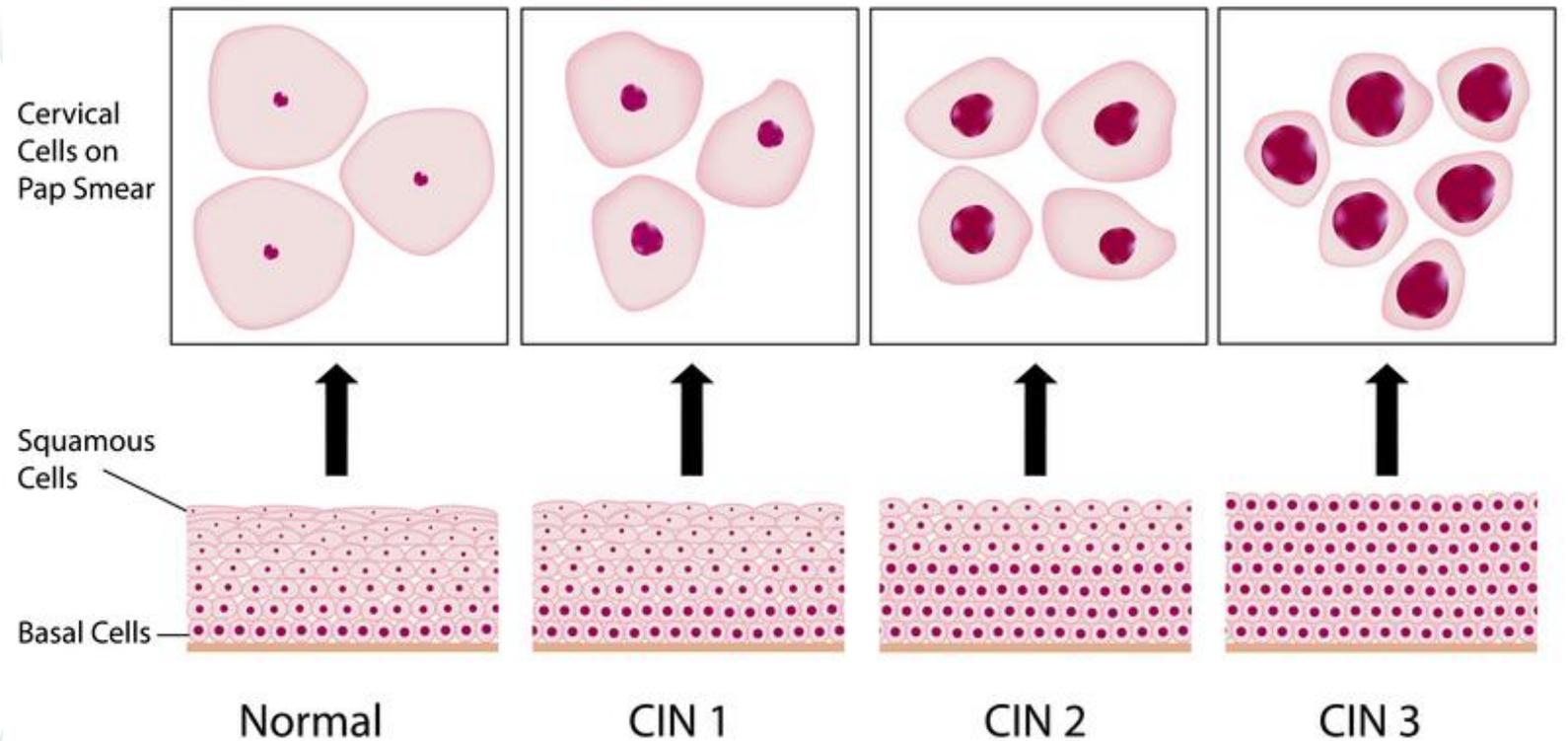
Il Pap test (test di Papanicolaou, dal cognome del medico che lo ha inventato) e il test per il Papilloma virus (HPV-DNA test) sono due esami di screening che hanno contribuito significativamente a ridurre la mortalità per tumore della cervice uterina

PAP test

Il Pap test è un esame di screening la cui funzione principale è quella di valutare **la normalità delle cellule della cervice uterina** o, al contrario, di individuare le donne affette da lesioni non ancora di tipo tumorale, ma che sono a rischio di sviluppare il cancro. Esame citologico eseguito a partire dalla raccolta delle secrezioni dal collo dell'utero.

L'operatore preleva una piccola quantità di secrezioni dal collo dell'utero. Le cellule esfoliate dal tessuto di rivestimento della cervice nel canale vaginale saranno sottoposte a colorazione ed analisi citologica.

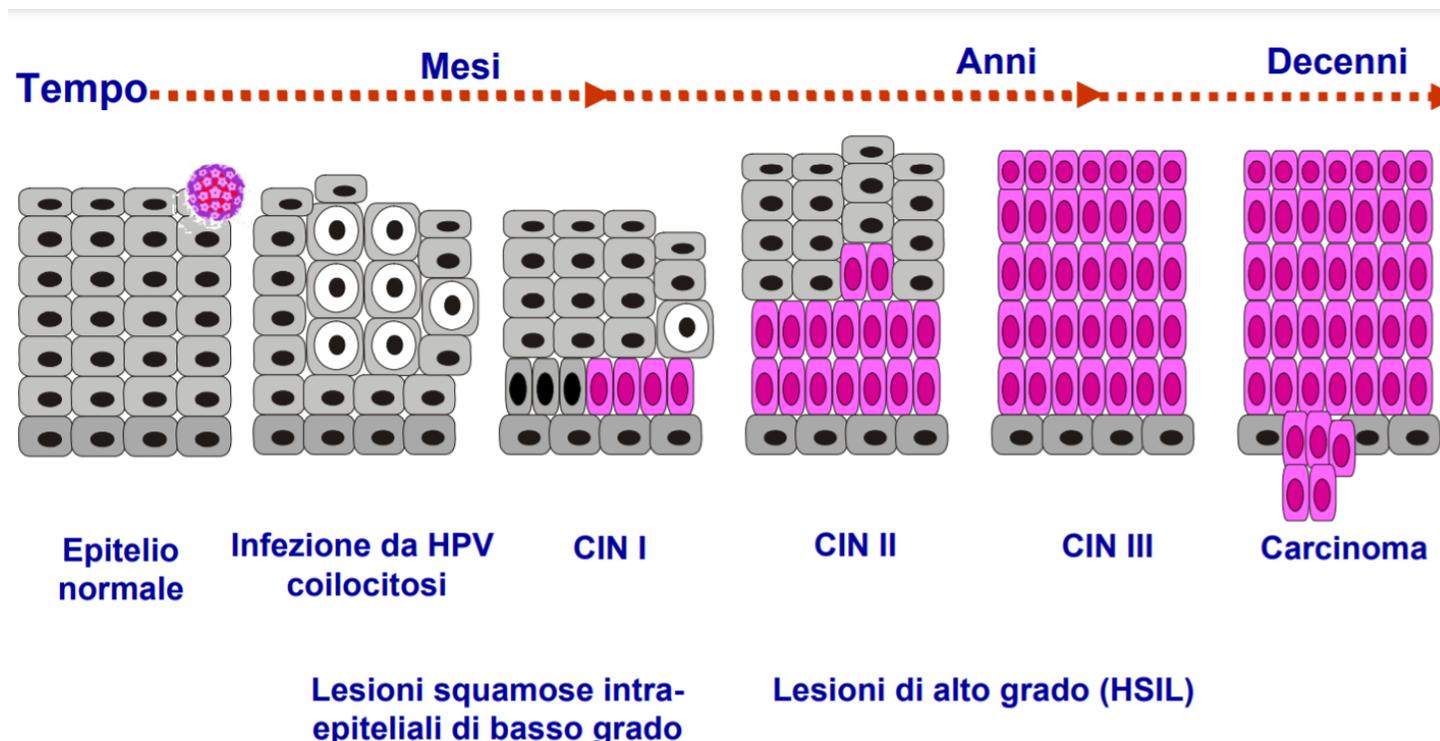
Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN)



neoplasie intraepiteliali cervicali (CIN)

**Il carcinoma della
cervice è un esito raro
di un'infezione
frequente.**

Il lungo tempo di latenza tra
infezione da HPV, CIN ed
insorgenza di Carcinoma
alla cervice consente la
prevenzione secondaria
attraverso lo screening



HPV

In questi ultimi anni sono a disposizione nuovi marcatori che migliorano la specificità della citologia e dell'istologia cervicale.

Infatti gli studi riguardanti i marcatori di attivazione e di progressione della cancerogenesi virale (mRNA di E6-E7, MIB-1/Ki-67, ProEXC, p16)

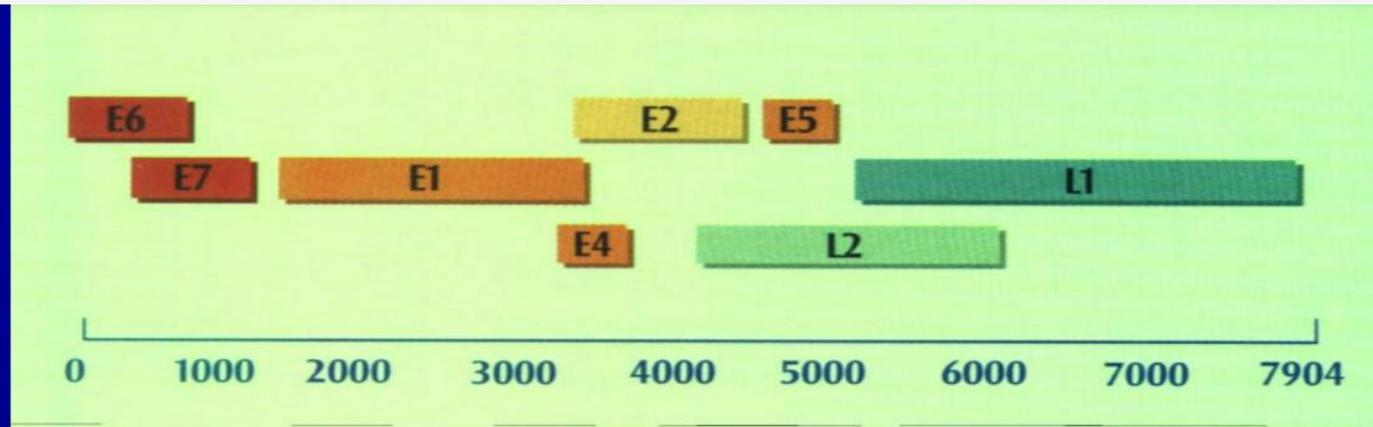
HPV test

Il **test HPV** (detto anche **DNA HPV test**) consiste nel prelievo di una piccola quantità di cellule dal collo dell'utero (o cervice uterina) che vengono successivamente analizzate per verificare la presenza di **Papillomavirus**. Si effettua per ricercare il DNA dei tipi virali ad alto rischio

Donne negative nuovo screening

Donne positive sottoposte a citologico

Human Papilloma Virus (HPV)



E1 inizio della replicazione (elicasi)

E2 regolaz. trascrizione/replicazione DNA

E4 proteina tardiva non strutturale

E5 proteina trasformante

E6 proteina trasformante, lega la p53

E7 proteina trasformante, lega la pRB

L1 proteina capsidica maggiore principale

L2 proteina capsidica minore

Human Papilloma Virus (HPV) PCR

- I primers utilizzati (GP5+/GP6+) sono disegnati per amplificare sequenze altamente conservate del genoma virale di HPV nella regione L1, E1 ed E6/E7.
- La PCR è altamente sensibile e specifica
- Il metodo richiede solo piccole quantità di campione
- I singoli passaggi possono essere automatizzato
- campioni citologici raccolti in fase liquida - tessuti in paraffina

HPV PCR

- Test PCR in vitro in campioni citologici in fase liquida individua 13 tipi di HPV ad alto rischio: 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 68.
- Permette la simultanea amplificazione in PCR del DNA HPV target e del gene umano β -globina (controllo interno)

HPV, PCR

Per valutare espressione di oncogeni E6/E7 si impiega PCR primers specifici

Queste proteine oltre ad essere coinvolte nella promozione della sintesi di DNA virale e nella produzione di virioni maturi, **interferiscono con le proteine cellulari p53 e pRB**, responsabili dei normali checkpoints del ciclo cellulare della cellula ospite, favorendo la trasformazione neoplastica..

HPV

Per valutare carica virale si impiega La PCR quantitativa Real-Time rappresenta l'approccio migliore per la quantificazione degli acidi nucleici e, in particolare, nel determinare la carica virale dell'infezione da HPV. Diversi studi hanno mostrato che pazienti con alta carica virale di HPV possono avere un rischio aumentato di sviluppare il cancro della cervice.

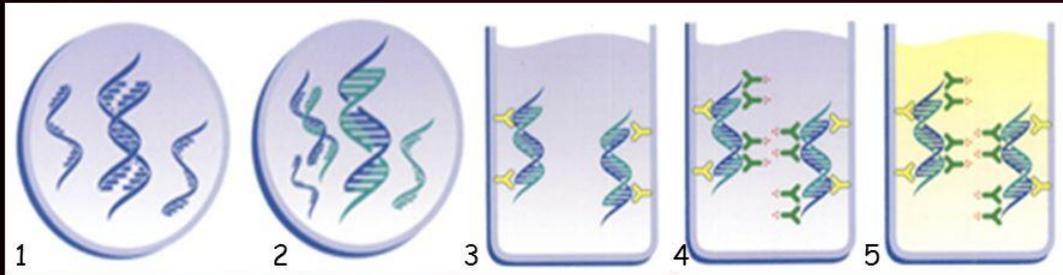
HPV Hibrid Capture II

- Ricerca del DNA di HPV in campioni citologici mediante saggio Hibrid Capture II
- Accreditato con sensibilità clinica del 96% e di un valore predittivo negativo del 99%

Meno suscettibile a problemi di contaminazione e inibizione della PCR e più sensibile della Ibridazione in Situ

Human Papilloma Virus (HPV) Hybrid Capture II

HPV-DNA testing: Hybrid Capture II



1. Rilascio e denaturazione degli acidi nucleici
2. Ibridazione della sonda dell'RNA con il DNA bersaglio
3. Cattura degli ibridi dell'RNA: DNA in una fase solida
4. Reazione degli ibridi catturati con anticorpi coniugati multipli
5. Rilevamento del segnale chemiluminescente amplificato

Sierotipi
disponibili

Basso Rischio	6, 11, 41, 42, 43, 44
Rischio Intermedio	31, 33, 35, 39, 51, 52
Alto Rischio	16, 18, 45, 46

ibrido RNA/DNA

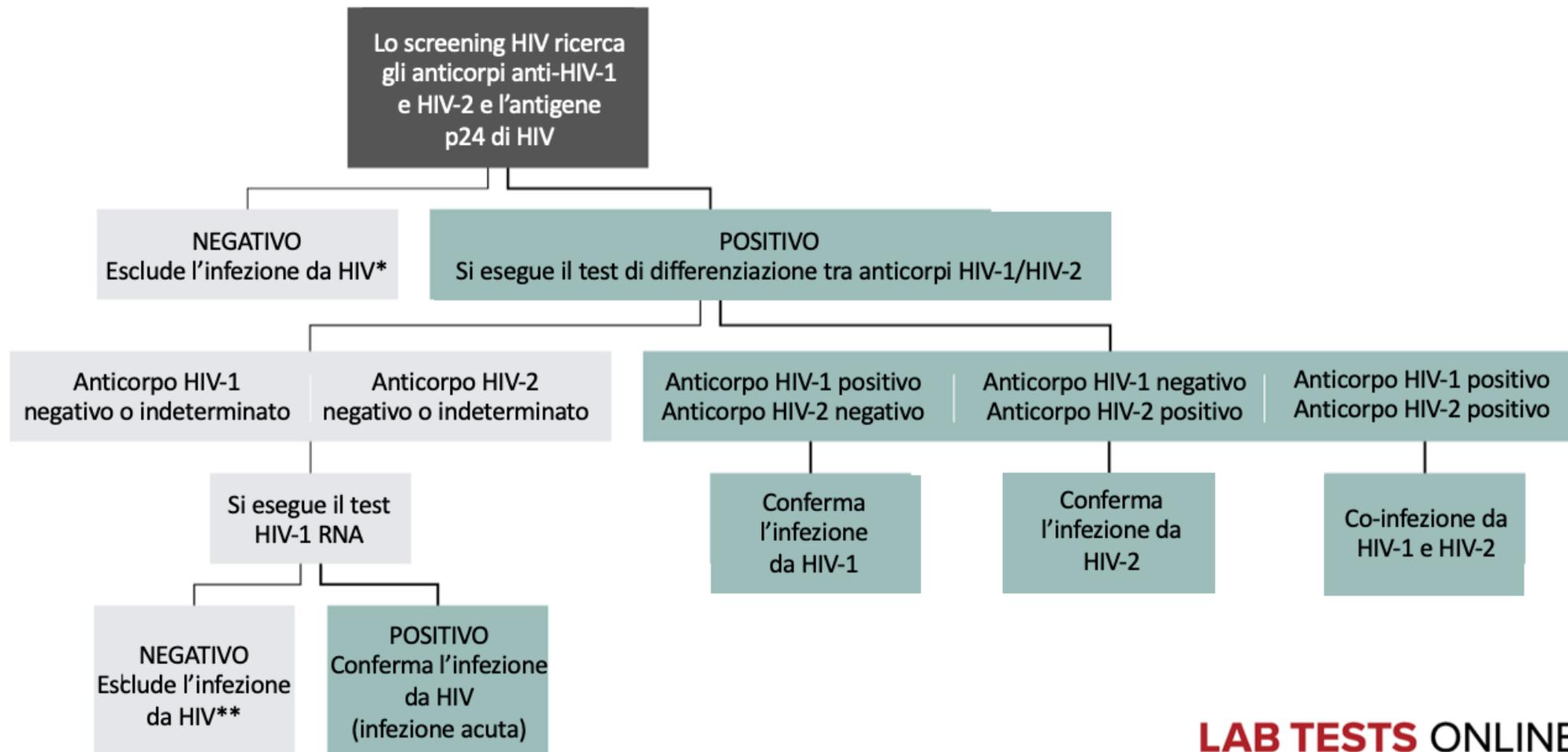
1. Denaturazione degli acidi nucleici
2. Ibridazione del DNA con sonde di RNA in fase liquida
3. Cattura degli ibridi RNA/DNA in fase solida
4. Rivelazione con reazione degli ibridi catturati e Ab coniugati multipli
5. Misurazione del segnale chemiluminescente con luminometro

HIV

HIV, retrovirus responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)

Secondo le linee guida internazionali la diagnosi di infezione da HIV può essere eseguita solo su esami sierologici per questo i saggi di riferimento sono ELISA e WB per la ricerca di anticorpi anti-HIV e dell'antigene p24.

ALGORITMO DEL CDC PER IL TEST DELL'HIV



*Se il test di screening è negativo, ma si sospetta un'esposizione recente ad HIV, si esegue il test HIV-1 RNA oppure viene raccolto un nuovo campione su cui ripetere il test di screening

**Se il test di screening è negativo, ma si sospetta un'esposizione recente ad HIV, viene prelevato un nuovo campione su cui ripetere il test

LAB TESTS ONLINE

Your Trusted Guide

Understand your tests. Empower your health.

A PROGRAM OF **AACC**

HIV

Primo parametro rilevabile dopo l'infezione è però presenza di RNA virale nel plasma → DNA provirale nei linfo-monociti del sangue periferico → circolazione antigene p24 (proteina del core virale)



HIV

Misurazione della concentrazione dell'RNA virale (RT-PCR)

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

Branched-chain DNA

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

Usata per l'amplificazione di RNA. L'RNA bersaglio è retrotrascritto in cDNA con un primer che contiene la sequenza per il promotore della T7 RNA polimerasi, segue la sintesi di RNA con una RNA polimerasi.

Si basa sullo schema di trasferimento dell'informazione genica caratteristico del meccanismo di replicazione dei genomi dei retrovirus: da **RNA a DNA e, di nuovo, RNA**

L'amplificazione è isotermica, non richiede un termociclatore, non necessita di enzimi termostabili, avviene in un unico passaggio ed ha un grado di sensibilità pari alla RT-PCR

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

3 enzimi (RNA polimerasi T7, RT, RNasi H) e 2 primers specifici

Un primer funziona come molecola ibrida con due distinti domini e funzioni: il primo dominio è complementare alla sequenza target, mentre il secondo contiene un promotore per una RNA polimerasi. L'altro primer occorre per sintesi cDNA

1) L' enzima RT sintetizza DNA a partire dall'RNA. Ibrido RNA-DNA.

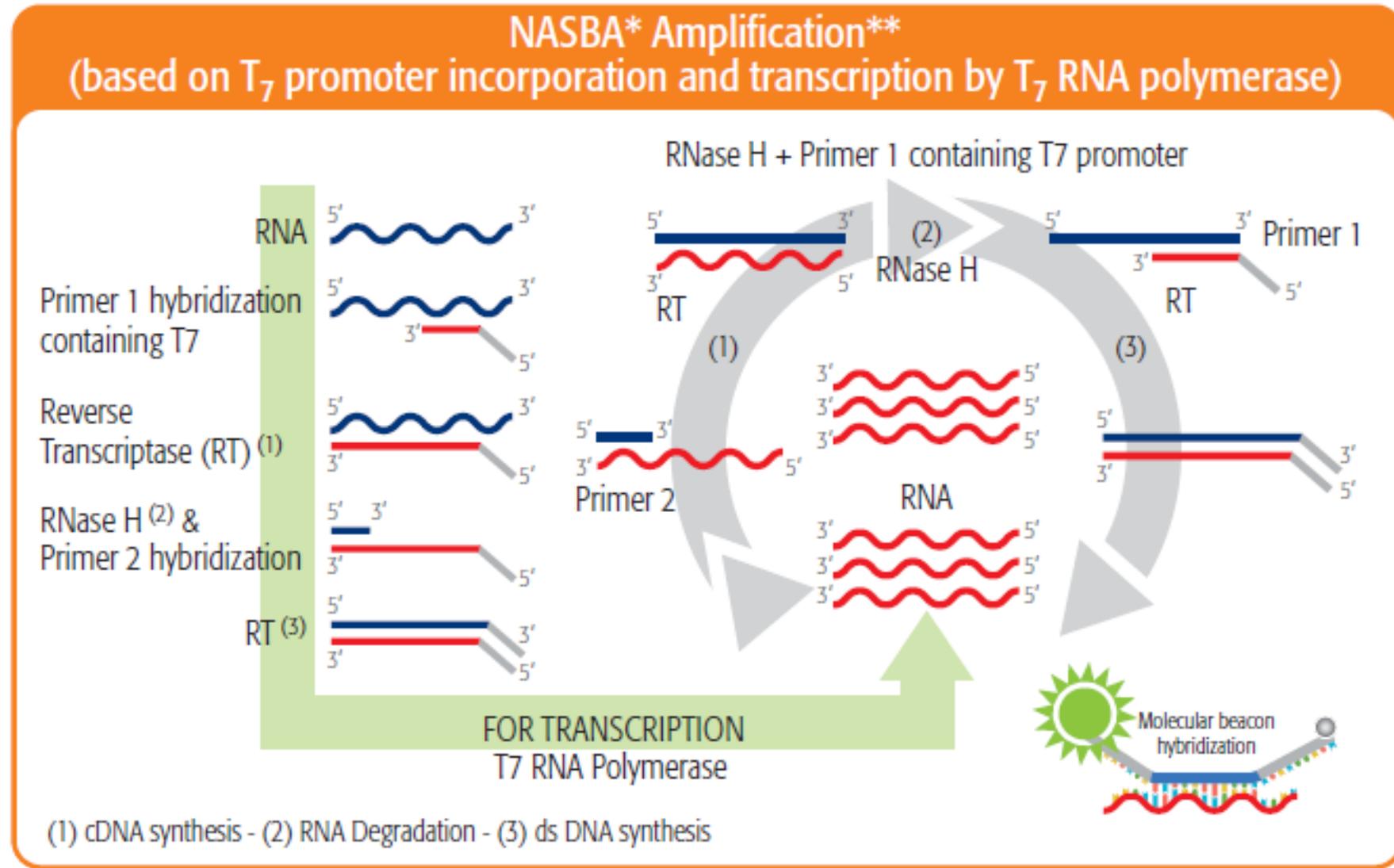
2) L' enzima RNAsi-H degrada RNA e quindi il secondo primer si lega al DNA ed inizia la sintesi del cDNA.

3) L' enzima T7 RNA polimerasi (DNA dipendente) trascrive il doppio filamento di DNA partendo dal promotore presente sul primo "ibrido" primer .

Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)

I prodotti sono quantificati mediante curva di taratura

- RNA**
- PRIMER 1 retro**
- RNA/DNA**
- Rnasi h**
- ssDNA**
- PRIMER 2**
- dsDNA con promotore T7 attivo**



Altri test diagnostici dell'HIV

- Conta dei linfociti CD4
- Test di resistenza genotipica dell'HIV ai farmaci antiretrovirali
- ricerca dell'allele HLA-B*5701

DIAGNOSTICA COVID

- -"**CO**" - *Corona*, "**VI**" - *Virus* e "**D**" per *Disease*, **19** sta ad indicare l'anno durante il quale il virus è stato identificato per la prima volta
- I coronavirus sono una vasta famiglia di virus noti per causare malattie che vanno dal comune raffreddore a malattie più gravi come la **Sindrome respiratoria mediorientale** (MERS, *Middle East respiratory syndrome*) e la **Sindrome respiratoria acuta grave** (SARS, *Severe acute respiratory syndrome*).
- Sono virus a RNA a filamento positivo, con aspetto simile a una corona al microscopio elettronico.

- **Spike protein (S)** ~150 kDa

Attaches to ACE-2 receptor

- **Membrane protein (M)**

~25-30 kDa Provides shape

- **Envelope protein (E)**

~8-12 kDa, Guides assembly and release

- **Nucleocapsid protein (N)**

~50 kDa, Protects RNA

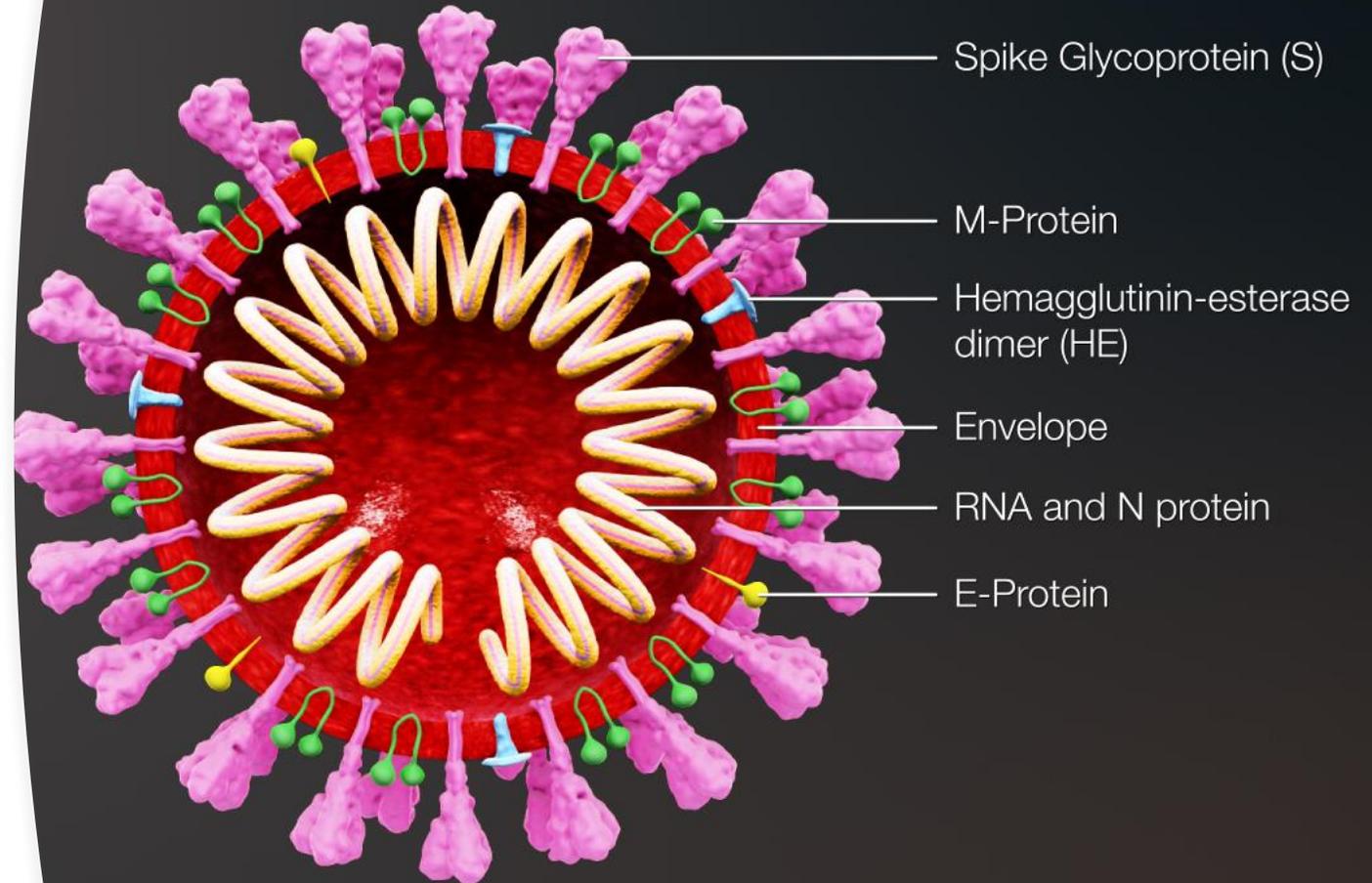
- **RNA viral genome**

~30,000 nucleotides

Encodes 29 proteins

- **Lipid envelope**

Acquired from host cell



DIAGNOSTICA COVID

Esistono diversi tipi di analisi di laboratorio per studiare l'infezione da SARS-CoV-2. I dati vanno registrati **OBBLIGATORIAMENTE** sul registro di Tracciatura Tamponi della Regione Abruzzo (**ATTRA**) di cui alla OPGR n. 39 del 18 aprile 2020;

- Analisi della presenza del virus nelle mucose orofaringee e rinofaringee (il cosiddetto **tampone MOLECOLARE**)
- Analisi della presenza del virus nelle mucose orofaringee e rinofaringee (detto **Tampone Rapido**)
- Tampone salivare rapido
- Analisi per lo studio della presenza di anticorpi contro il SARS-CoV-2 nel sangue (detto **Sierologico**)

DIAGNOSTICA COVID

**tampone
naso
orofaringeo**

TEST
MOLECOLARE

ricerca il **materiale genetico** del virus
TEST MOLECOLARE (PCR) 24/48 h

TEST
ANTIGENICO

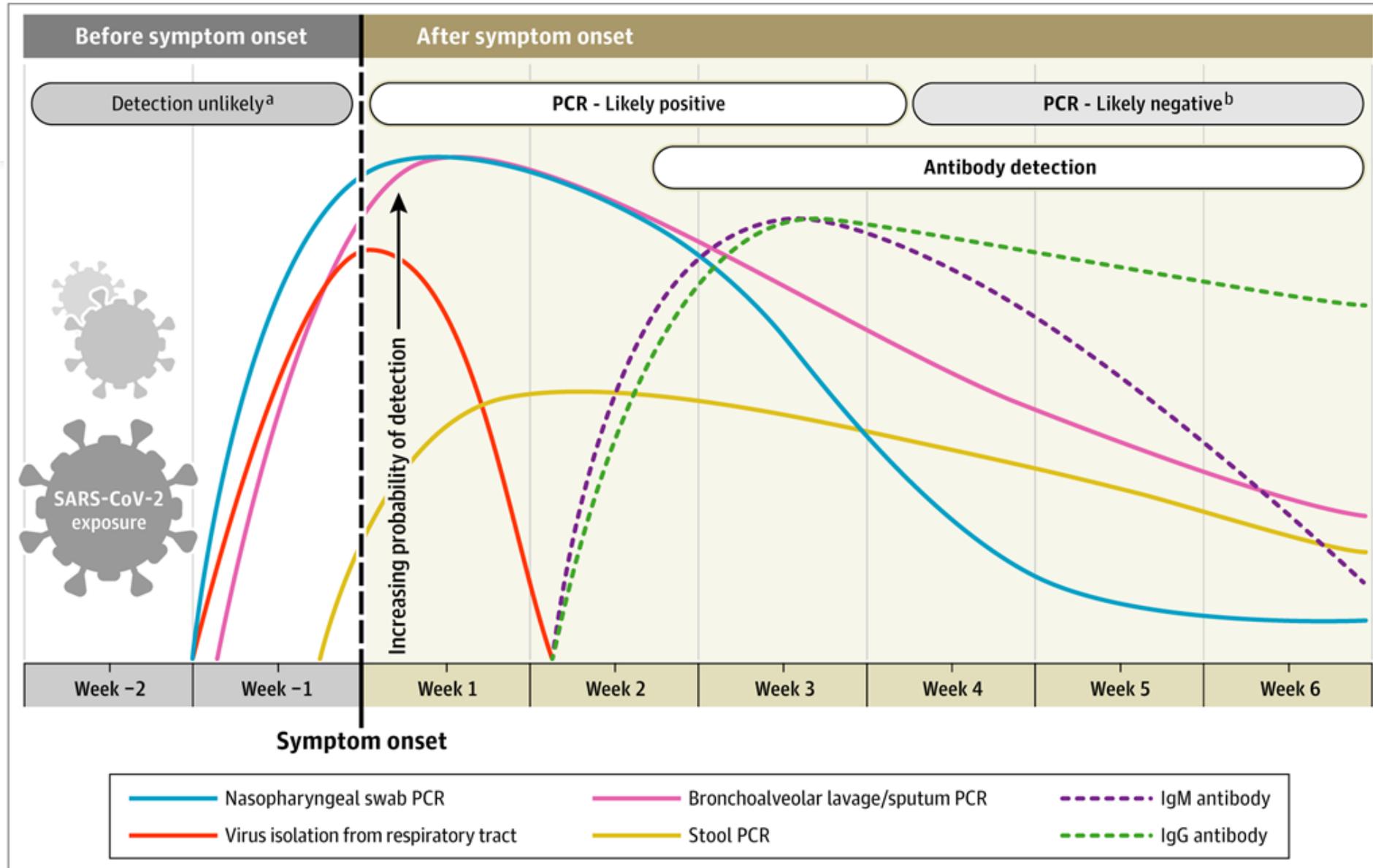
ricerca la presenza di **proteine** del virus
(Proteine Spike) (10-15 minuti)

**Campione
Sierologico**

TEST
SIEROLOGICO

ricerca gli **anticorpi diretti contro** il virus
DA PLASMA (Titolo anticorpale) (24h circa)
PUNGIDITO (Sangue capillare)
qualitativo 10-15'
Semiquantitativo 24

DIAGNOSTICA COVID



DIAGNOSTICA COVID

Il test avviene prelevando dal paziente un campione della **secrezione** che copre la **mucosa** della faringe posteriore, e materialmente si tratta di strofinare leggermente una sorta di **bastoncino cotonato**. Il tampone raccoglie cellule degli epitelii che ricoprono la faringe. Successivamente nel naso. Queste cellule se il paziente è infetto contengono il virus. Una volta terminato il tampone il bastoncino va inserito nella provetta contenente il terreno di trasporto, in genere una soluzione fisiologica. I tamponi non vanno conservati a secco o introdotti in altri preparati per microbiologia.

ATTENZIONE:

Nuove disposizioni prediligono solo la raccolta dal naso per evitare diluizioni salivari.

Il test molecolare (tampone)



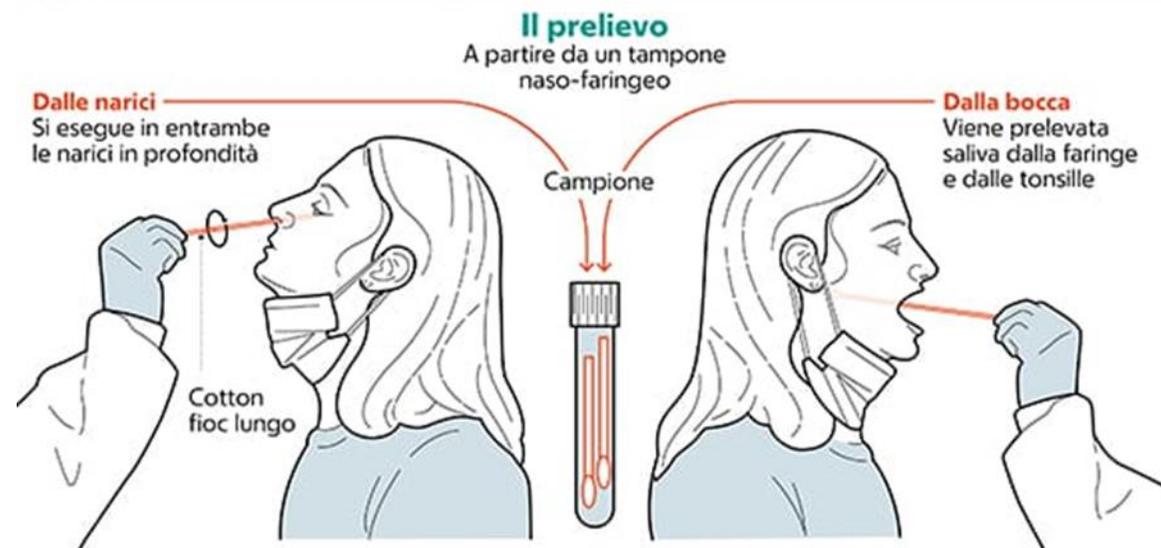
A cosa serve
Rileva un'infezione da Coronavirus in fase attiva e la sua carica virale



Esito
È il test più accurato che c'è al momento per la diagnosi

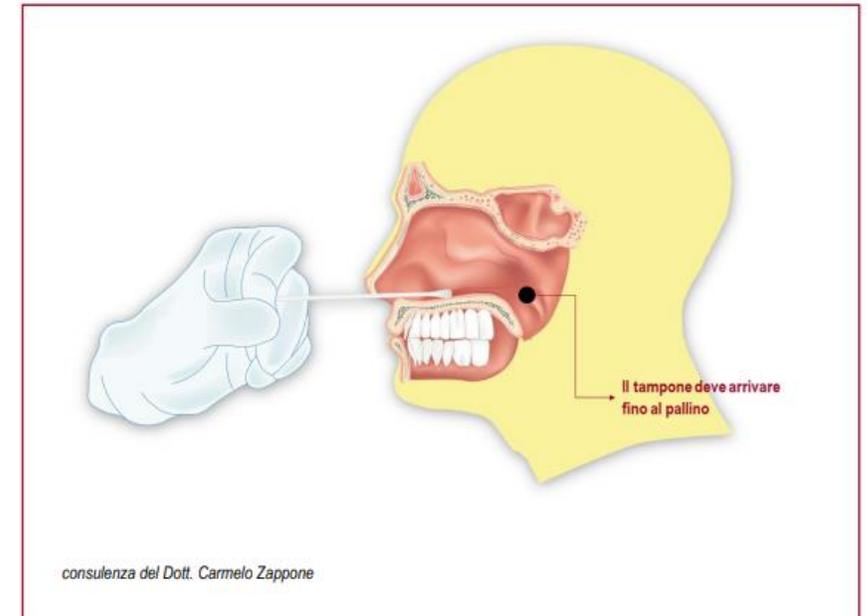


Tempo di risposta
Almeno **12-24 ore**
(in caso di eccessiva richiesta alcuni giorni)



Esecuzione del tampone

- alte vie respiratorie zona retro tonsillare e rinofaringea (tampone nasale, tampone oro-faringeo, tampone rino-faringeo)
- basse vie respiratorie: aspirato endo-tracheale o lavaggio bronco-alveolare (Broncho-Alveolar Lavage, BAL).



Etichettatura del campione e scheda di accompagnamento



- Cognome, nome e data nascita
- Data del prelievo

ALLEGATO 2 - SCHEDA PRELIEVO TAMPONE RINO-OROFARINGEO RICERCA SARS-COV-2

Cognome _____ Nome _____
 Luogo e Data di Nascita _____ Cod. Fisc. _____
 Indirizzo _____ Tel. _____
 E-Mail _____
 Domicilio ove diverso dalla residenza _____
 Numero di telefono di un contatto di emergenza _____

Medico richiedente:
 Cognome _____ Nome _____ Tel. _____
 MMG PLS MCA SISP Direttore UO Medico Competente

Note cliniche: Sintomatico Asintomatico

Terapie in corso: _____

Eventuali osservazioni: _____

Livello di priorità: Rosso Giallo Verde

Prelievo effettuato su: Utente Dipendente ASL

Informazioni aggiuntive in caso di prelievo su Operatore Sanitario:
 Sede lavorativa: _____
 Contatti stretti (Domicilio e recapito telefonico): _____

COLORE ADESIVO	TIPOLOGIA DI UTENTI
rosso	rosso pazienti sintomatici per dispnea e sintomi correlati o contatti stretti
giallo	pazienti dimissibili
verde	Screening territoriali

Trasporto dei campioni

- I campioni devono essere inviati immediatamente al laboratorio o in alternativa possono essere conservati in frigo (+4°C) per un tempo < 48 ore. Se il campione non può essere processato entro 48 ore va conservato a -80°C.
- Triplo imballaggio
 - Contenitore
 - Sacchetti per trasporto campione biologico (1 • barriera)
 - Contenitore rigido per il trasporto (2• barriera)
 - Imballo esterno (3° barriera)

Covid Pandemic in Italy: Testing in Abruzzo

- In abruzzo 4 laboratories have been authorised for molecular analysis, 1 for each provice
- >400000 swab tests have been performed since the beginning of the pandemic
- Currently approximatelly 2000 tests per day are performed
- Tests are performed on :
 - Sanitary personnel (periodic screening)
 - Eldercare institutes
 - Simptomatic people refered by general practitioners
 - People that have reported contact with positive subjects
 - At the airport to people arriving on flights from Spain, Croatia, Rumenia and Malta
 - A drive in swab spot has been set up from people coming back from holidays from countries or italian regions with higher number of new infections (i.e Sardinia)
- Antibody detection is not generally performed however is offered by many laboratories and many people decide to be tested

-The laboratory at the CAST institute of the University of Chieti was asked to set up a laboratory for molecular analysis of swab tests for the province of Chieti.

-We have set up the lab with the help of research personnel from the institute that volunteered, we later hired and trained personnel to perform the analysis.

-The lab was officially authorised and started testing at the **beginning of April.**

-Currently we are equipped we have two BLS2 labs equipped with cell culture hoods and two nucleic acid extractors, and 4 thermocyclers.

-At the moment we perform about **2000** tests per day.



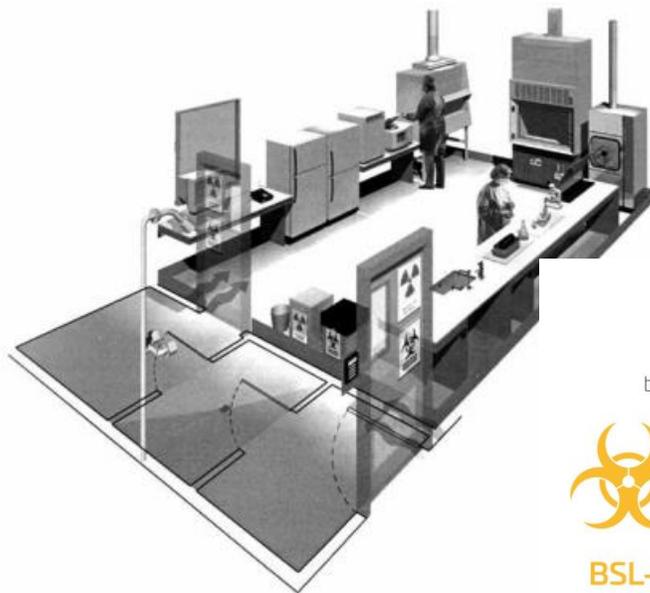
Laboratorio BLS di classe di tipo 2

Laboratorio
Locale o di
riferimento regionale
e nazionale ISS

Tecnici di laboratorio
(si raccomanda
riduzione al minimo del
numero di operatori
esposti; formazione e
addestramento specifici)

Manipolazione di campioni
respiratori

- Laboratorio BSL di classe 3
(coltura per isolamento del virus)
con procedure e DPI conseguenti
- Laboratorio BSL di classe 2
(diagnostica con tecniche di biologia molecolare)
con procedure e DPI conseguenti



BIOSAFETY LEVELS

basic classes of laboratory risks from low to high



Il laboratorio è separato dal flusso di passaggio generale delle persone e vi si accede attraverso un'anticamera (ingresso a porta doppia o laboratorio di base, oppure una camera di compensazione

ventilazione meccanica con flusso d'aria verso l'interno senza ricircolo a pressione negativa

<https://abruzzo.zonalocale.it/2020/03/26/test-sul-covid-19-al-cast-di-chieti-al-via-lo-screening-sul-personale-sanitario/44837?e=abruzzo>

DIAGNOSTICA COVID

- **1-Inattivazione del virus:** si fa unendo una parte del liquido in cui è stato messo il tampone con una soluzione denaturante. Questo denaturando le proteine del capsido ne determina la rottura. Questo passaggio è anche il primo passaggio della purificazione dell'RNA virale.
- **2- Estrazione dell'RNA:** viene fatto con diversi metodi basati sull'adesione dell'RNA a matrici solide ad un determinato pH seguito da una serie di lavaggi che rimuovono tutte le altre molecole (lipidi, ma soprattutto proteine) ed infine eluizione dell'RNA (distacco dalla matrice solida) con una soluzione a PH diverso.

DIAGNOSTICA COVID

- **3-Retrotrascrizione dell'RNA:** si sfrutta l'enzima trascrittasi inversa di origine sintetica ma derivato da virus che copia il filamento di RNA in DNA.
- **4-Amplificazione e rilevazione dell'DNA amplificato:** si fa sfruttando un enzima la Taq polimerasi che copia sequenze di DNA. Contemporaneamente la soluzione di reazione contiene coloranti (sonde) che diventano fluorescenti in maniera proporzionale alla quantità di DNA presente. Lo strumento rileva l'aumento di fluorescenza, quindi la presenza di DNA con la sequenza di interesse.
- I passaggi 3 e 4 vengono effettuati in delle macchine chiamate termociclatori che fanno variare in maniera ciclica la temperatura della provetta di analisi e contemporaneamente rilevano la fluorescenza.

Viral/ Pathogen Ultra Nucleic Acid Isolation

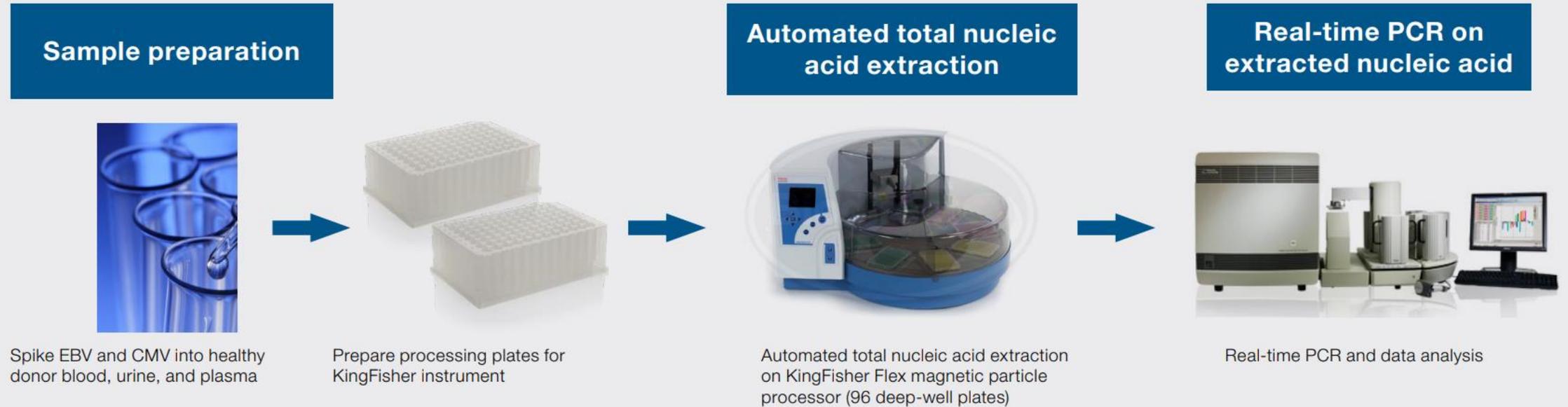


Figure 1. Workflow for extraction of viral total nucleic acid with the MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit and analysis with real-time PCR.

sample preparation

the binding buffer present in the MagMAX Viral/Pathogen can be used for nucleic acid isolation and has a sufficient concentration of guanidine thiocyanate to safely inactivate the virus.

Table 6. Sample prep protocol for the MagMAX Viral/Pathogen kit.

	400 μ L sample input	200 μ L sample input
Component	Volume per well	
Proteinase K	10 μ L	5 μ L
Sample (or nuclease-free water for negative control)	400 μ L	200 μ L
Binding bead mix (binding solution + beads)	550 μ L (530 μ L + 20 μ L)	275 μ L (265 μ L + 10 μ L)
MS2 phage control	10 μ L	5 μ L

96 deep-well configuration

50–1,000 μL



Magnetic head



Tip comb



Deep-well plates

Perform 1-Step RT-PCR

1. For each 2019-nCoV assay, combine the following components for the number of reactions, plus 10% overage:

Component	Volume per reaction
Master Mix (4X)	6.25 μ L
2019-nCoV assay (20X)	1.25 μ L
RNAse P assay (20X)	1.25 μ L
RT-PCR Grade Water	11.25 μ L
Total Reaction Mix volume	20.0 μL

2. For each reaction, combine the following components in a MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (0.2-mL) well.

Component	Volume per well
Reaction Mix (see step 1)	20.0 μ L
<ul style="list-style-type: none">• Nucleic acid research sample <i>or</i>• 1 μL 2019-nCoV Control v1 + 4 μL RT-PCR Grade Water <i>or</i>• NTC	5.0 μ L
Total reaction volume	25.0 μL

Stage	Step	Temperature	Time	
			TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix
Hold	UNG incubation ^[1]	25°C	2 minutes	N/A ^[2]
Hold	Reverse transcription	50°C	15 minutes	5 minutes
Hold	Activation ^[3]	95°C	2 minutes	20 seconds
Cycling (40 cycles)	Denaturation	95°C	3 seconds	3 seconds
	Anneal/Extension	60°C	30 seconds	30 seconds

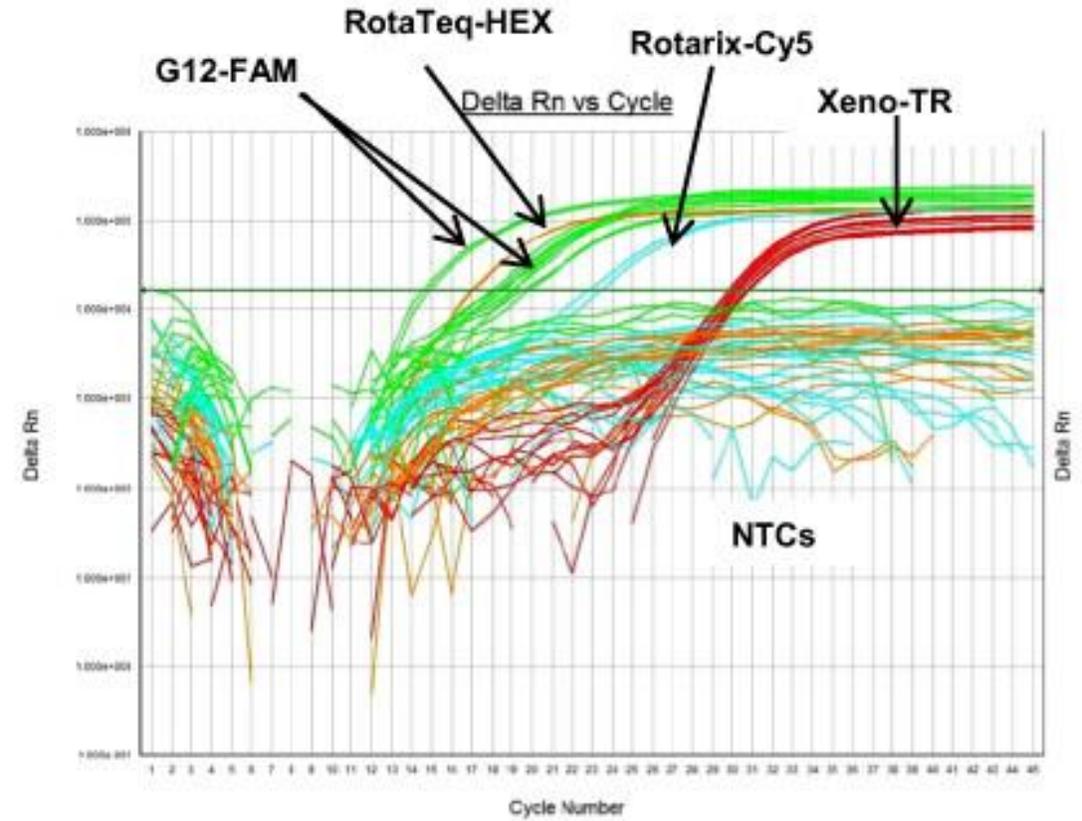
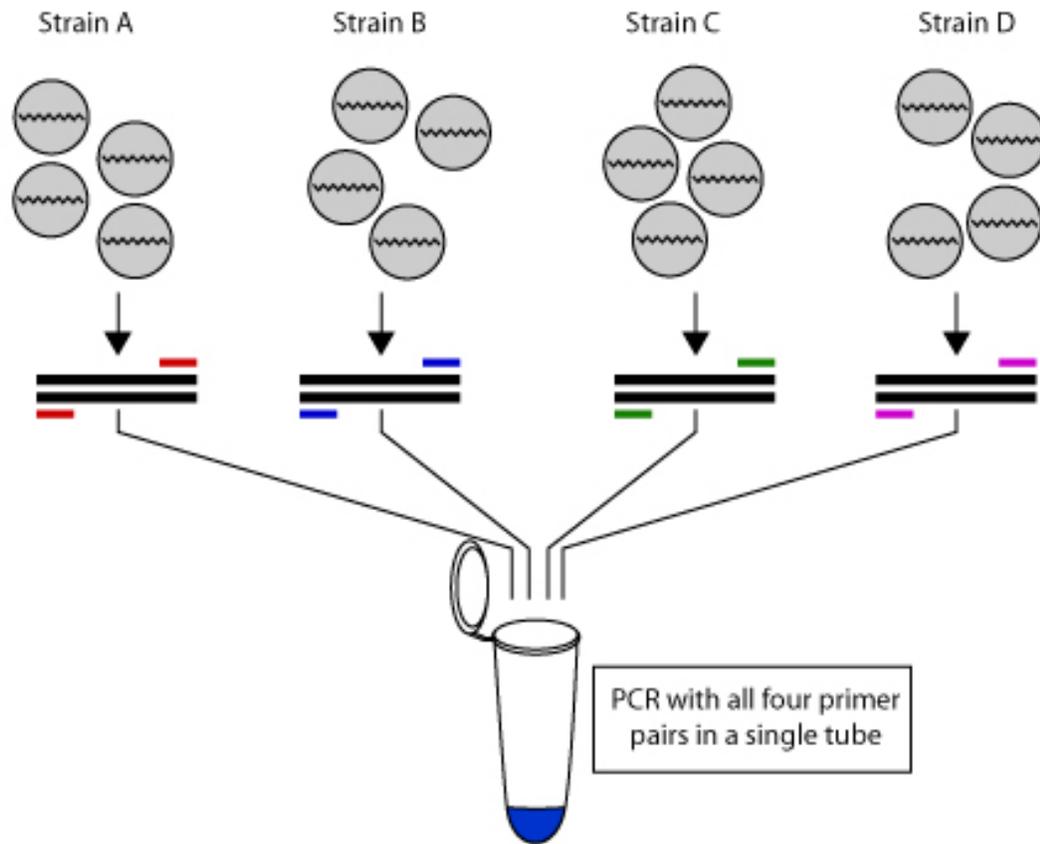
^[1] UNG incubation is not required for the TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix.

^[2] UNG incubation is not required for the TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix.

^[3] Activation is not required for the TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix.

2019-nCoV assay (FAM™ dye)	RNaseP assay (IPC) (VIC™ dye)	2019-nCoV assay result
$C_t < 37$	Any value	Positive.
$37 \leq C_t < 40$	Any value	Inconclusive. Repeat the test. Once the test is repeated, the result for the assay is positive if $C_t < 37$ or if the result is consistent with first test result of $37 \leq C_t < 40$.
$C_t = \text{Undetermined or } C_t = 40$	$C_t < 40$	Negative.
$C_t = \text{Undetermined or } C_t = 40$	$C_t = \text{Undetermined or } C_t = 40$	Invalid. Re-purify the nucleic acid from the sample, then repeat the test.

DIAGNOSTICA COVID



DIAGNOSTICA COVID

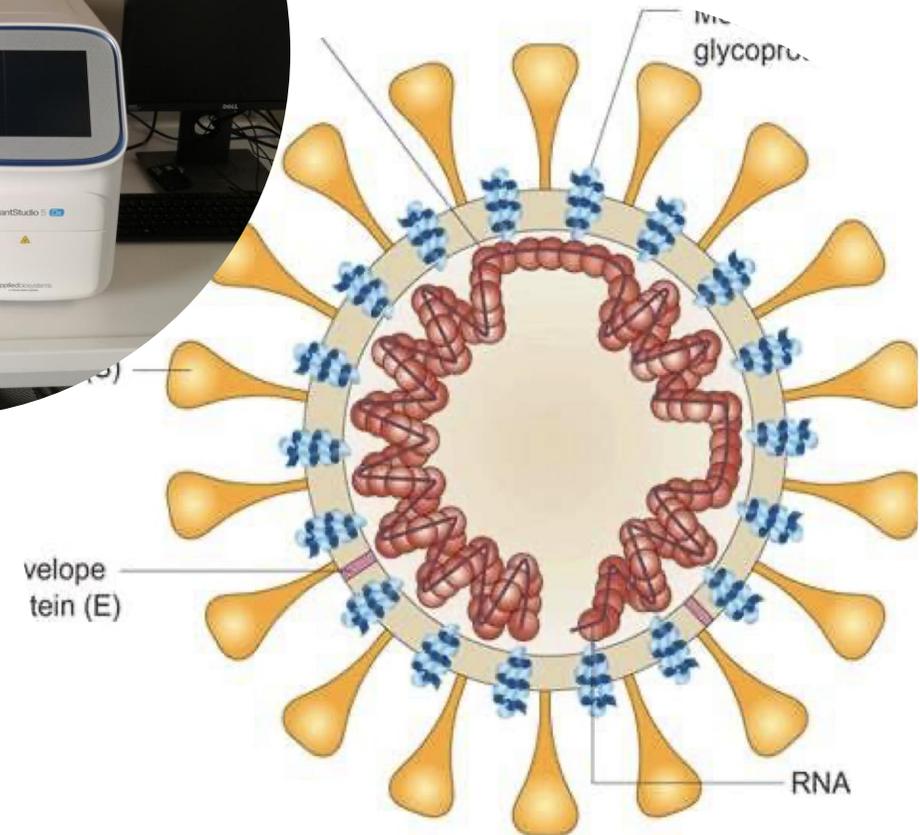
- **50° per 20'** a questa temperatura la trascrittasi inversa copia l'RNA in DNA a partire da sequenze di innesco (primers) inseriti nella soluzione.
- **95° per 15'** a questa temperatura vengono denaturate quindi inattivate tutte le proteine compresa la trascrittasi inversa. L'unica proteina che non viene denaturata e' la Taq polimerasi derivata da un batterio che vive ad alte temperature. In questa fase si separano anche i filamenti di DNA che devono essere copiati.
- **95° per 15''** serve a denaturare i filamenti di DNA neoformati per permetterne la copiatura
- **60° per 30''** serve a far funzionare la polimerasi che a questa temperatura ha la massima efficienza e copia i filamenti di DNA a partire da sequenze di innesco (primers) inseriti nella soluzione.

DIAGNOSTICA COVID

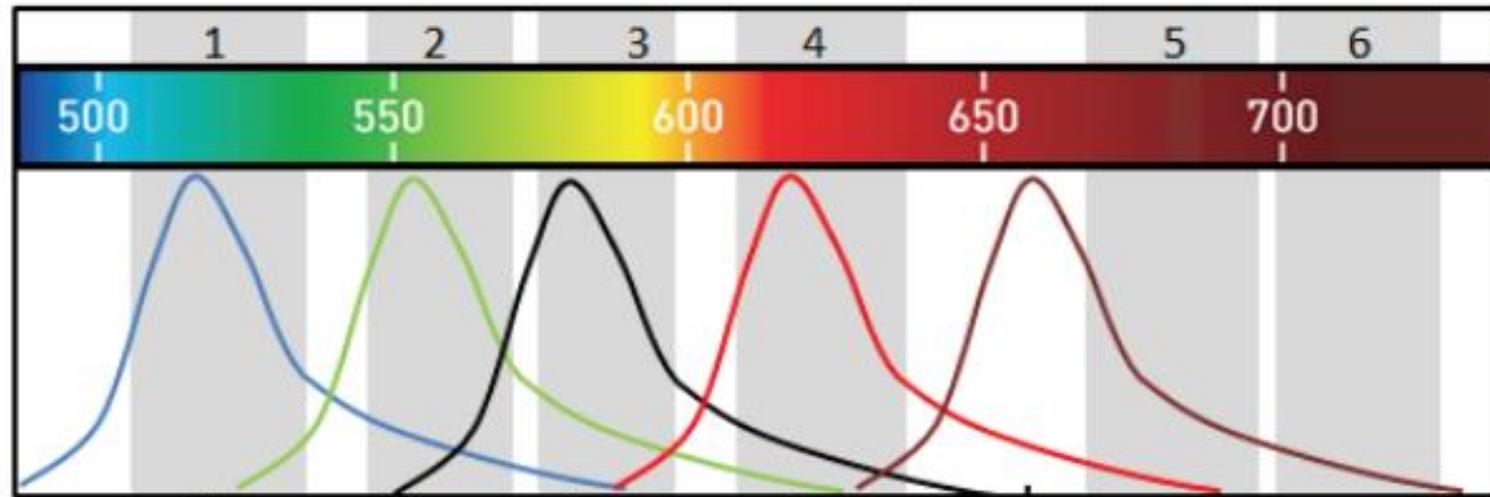
- I passaggi 3 e 4 vengono ripetuti molte volte (in genere 35-45 volte) permettendo di generare moltissime copie della sequenza iniziale (l'amplificazione avviene in maniera esponenziale)
- Il sistema è estremamente specifico, vengono copiate solo le sequenze riconosciute dai primers. Nella fase di amplificazione si usano due primers per copiare entrambi i filamenti. Il sistema alla fine genera (amplifica) filamenti di DNA a doppio filamento compresi tra i due primer.
- Il sistema è molto sensibile, da poche copie di RNA si generano quantità elevate di DNA copia, aumentando il numero di cicli si aumenta il numero di copie generate.

DIAGNOSTICA COVID

- Per l'analisi della infezione da SARS-CoV-2 si amplificano sequenze di uno o più geni del virus.
- Un numero maggiore di geni amplificati riduce il rischio di falsi positivi e falsi negativi.
- Attualmente il sistema migliore utilizza tre geni: N, S, Orf.



Filters wavelength (nm)



Emission spectra

Dyes

-517 nm
FAM

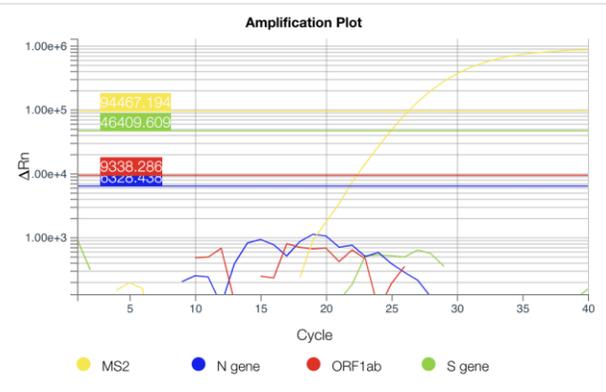
-551 nm
VIC

-580
ABY

nm -617
JUN

nm-654 nm
Mustang Purple

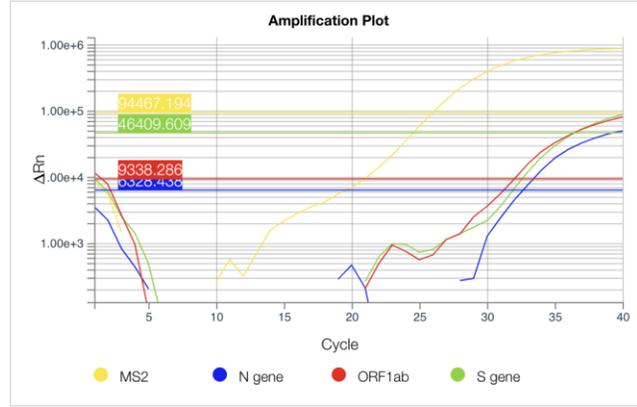
Reporter dye	Detector
FAM	ORF1ab
VIC	N gene
ABY	S gene
JUN	MS2



Well	Omit	Sample	Dyes	Cq
A9	<input type="checkbox"/>	789	VIC-NFQ-MGB	28.728
A9	<input type="checkbox"/>	789	FAM-NFQ-MGB	28.903
A9	<input type="checkbox"/>	789	JUN-NFQ-MGB	26.116
A10	<input type="checkbox"/>	790	ABY-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	VIC-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	FAM-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	JUN-NFQ-MGB	26.265
A11	<input type="checkbox"/>	791	ABY-NFQ-MGB	36.454
A11	<input type="checkbox"/>	791	VIC-NFQ-MGB	32.635
A11	<input type="checkbox"/>	791	FAM-NFQ-MGB	31.922
A11	<input type="checkbox"/>	791	JUN-NFQ-MGB	25.972
A12	<input type="checkbox"/>	792	ABY-NFQ-MGB	30.302
A12	<input type="checkbox"/>	792	VIC-NFQ-MGB	27.851
A12	<input type="checkbox"/>	792	FAM-NFQ-MGB	27.686
A12	<input type="checkbox"/>	792	JUN-NFQ-MGB	26.402
B1	<input type="checkbox"/>	793	ABY-NFQ-MGB	Undetermined



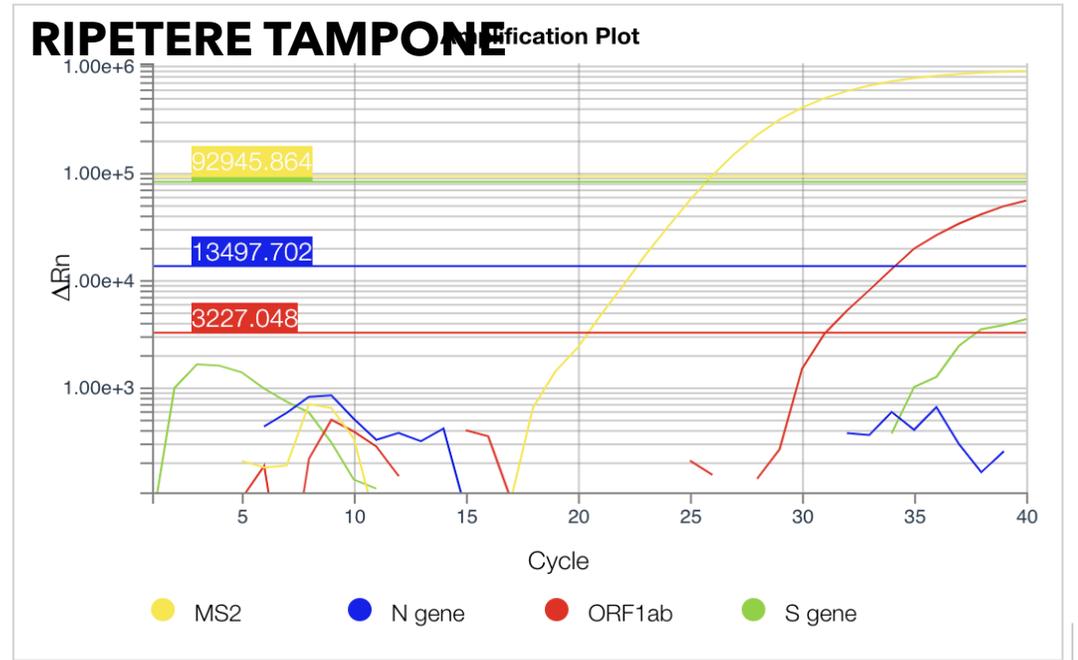
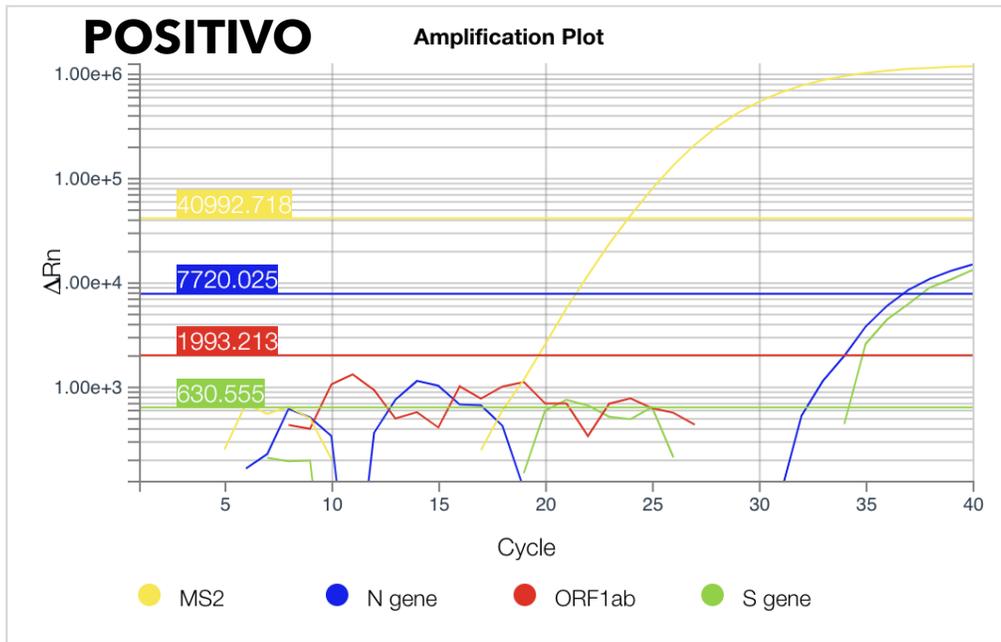
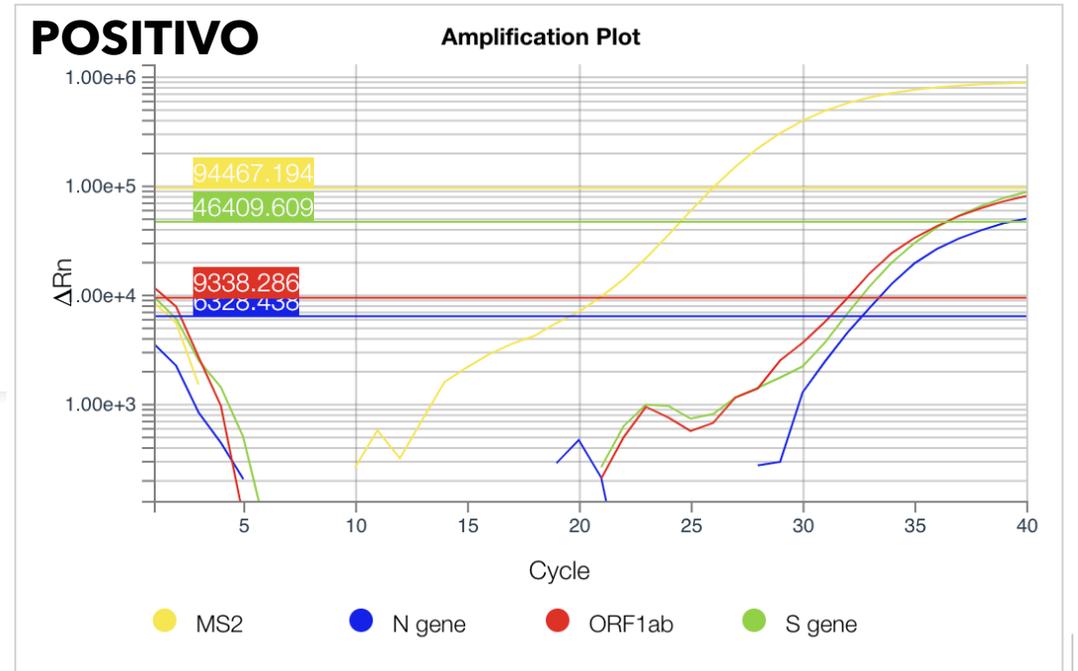
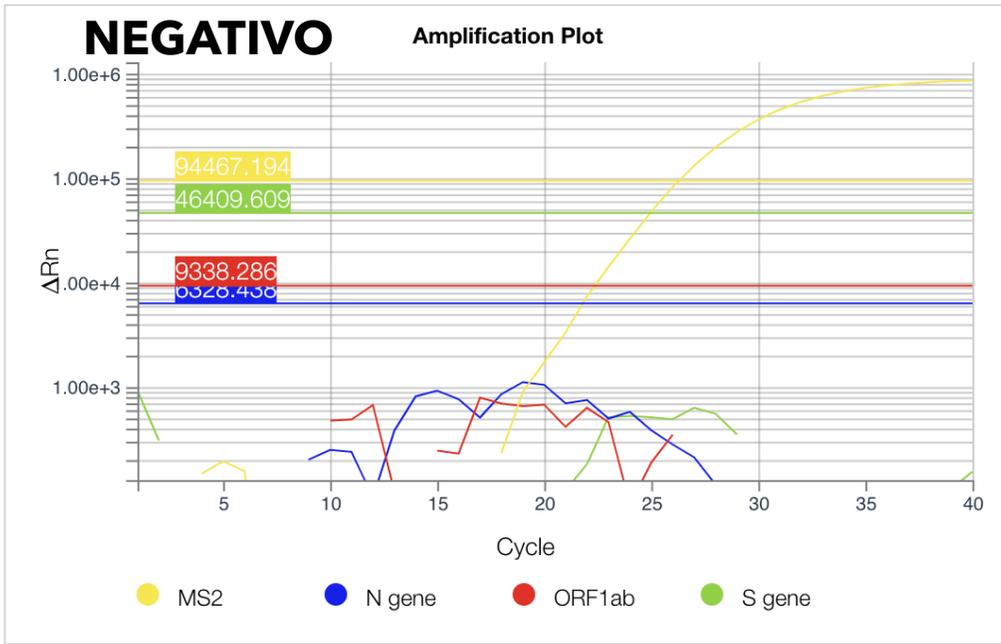
NEGATIVO



Well	Omit	Sample	Dyes	Cq
A9	<input type="checkbox"/>	789	ABY-NFQ-MGB	31.416
A9	<input type="checkbox"/>	789	VIC-NFQ-MGB	28.728
A9	<input type="checkbox"/>	789	FAM-NFQ-MGB	28.903
A9	<input type="checkbox"/>	789	JUN-NFQ-MGB	26.116
A10	<input type="checkbox"/>	790	ABY-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	VIC-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	FAM-NFQ-MGB	Undetermined
A10	<input type="checkbox"/>	790	JUN-NFQ-MGB	26.265
A11	<input type="checkbox"/>	791	ABY-NFQ-MGB	36.454
A11	<input type="checkbox"/>	791	VIC-NFQ-MGB	32.635
A11	<input type="checkbox"/>	791	FAM-NFQ-MGB	31.922
A11	<input type="checkbox"/>	791	JUN-NFQ-MGB	25.972
A12	<input type="checkbox"/>	792	ABY-NFQ-MGB	30.302
A12	<input type="checkbox"/>	792	VIC-NFQ-MGB	27.851
A12	<input type="checkbox"/>	792	FAM-NFQ-MGB	27.686
A12	<input type="checkbox"/>	792	JUN-NFQ-MGB	26.402
B1	<input type="checkbox"/>	793	ABY-NFQ-MGB	Undetermined



POSITIVO



TEST RAPIDO ANTIGENICO

Procedure Card of COVID-19 Antigen Rapid Test Device

1. Gently mix extraction buffer. Add 10 drops into the extraction tube

2a. For Nasopharyngeal swab (NP swab): Insert the swab into the nostril parallel to the palate, and gently pushing the swab into the posterior nasopharynx. Rotating against the nasal wall. (to ensure swab contains cells as well as mucus)

2b. For Oropharyngeal swab (OP swab): Insert the swab completely from the mouth into the throat, centering on the red part of the throat wall and maxillary tonsils, and rub the bilateral throat tonsils and throat wall moderately. Avoid touching the tongue and remove the swab

3. Insert the swab into the extraction tube. Mix well and squeeze the swab 10-15 times. After standing for 2 minutes, roll the swab head against the inner wall of the tube as you remove it. Try to release as much liquid as possible

4. Insert nozzle into sample extraction tube.

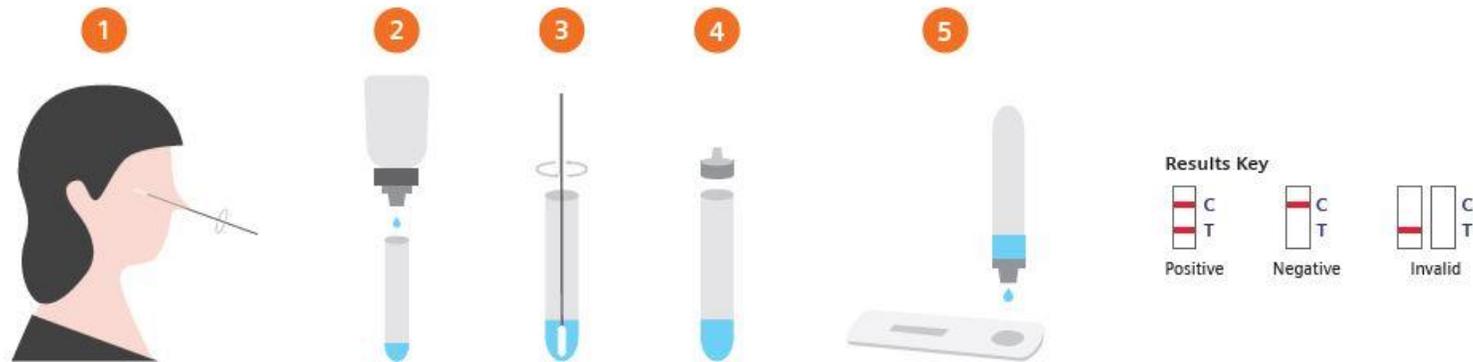
5. Add 2 drops of solution into the sample well by gently squeezing the tube.

6. Read results at 15 minutes.

7. Positive Negative Invalid

TEST RAPIDO ANTIGENICO

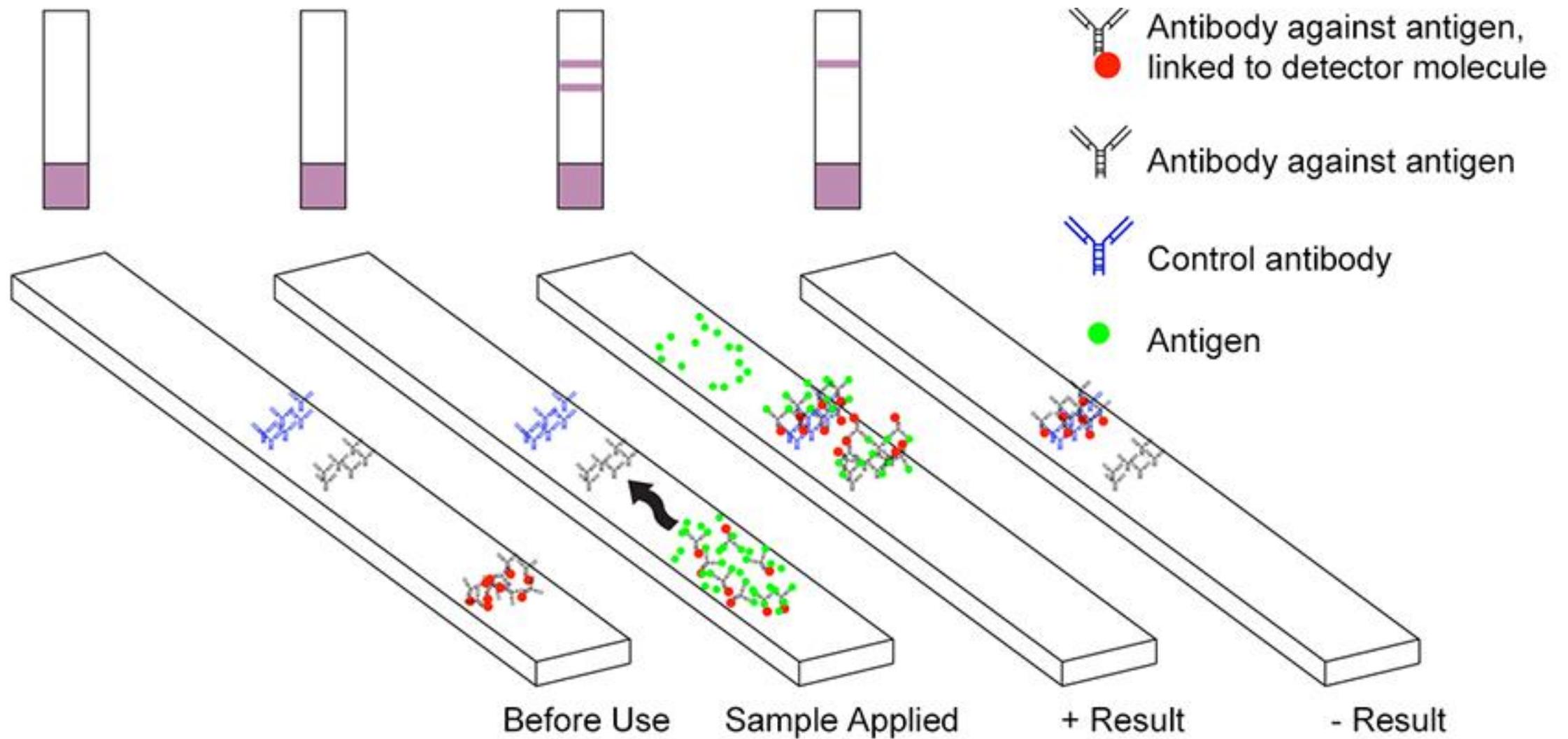
Simple-to-follow procedure for trained professionals



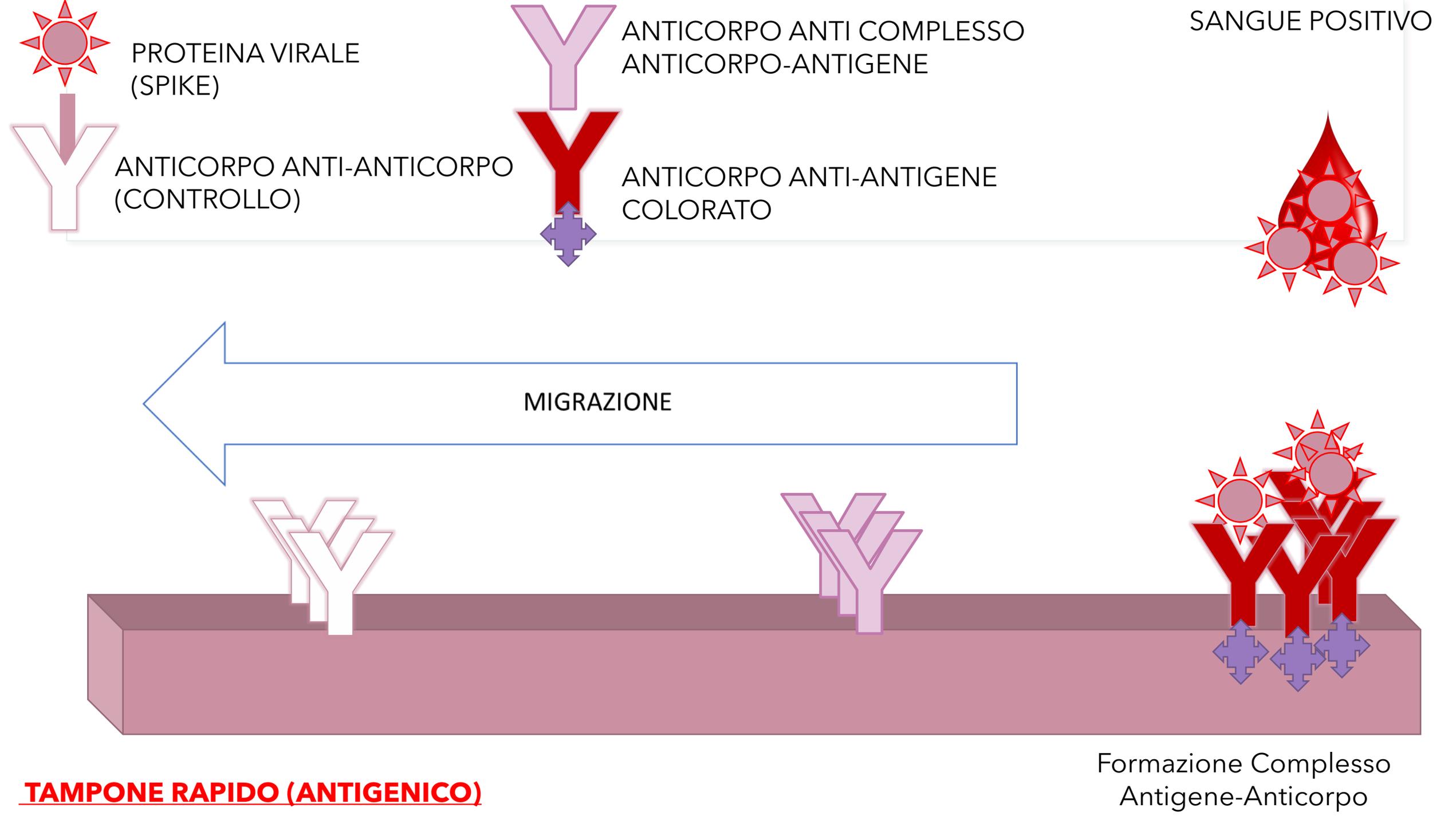
Do not use test kit after the expiration date. Bring specimen and test components to room temperature if needed (15–30° C) and use the appropriate personal protective equipment.

1. Gently rotate the swab several times over the surface of the posterior nasopharynx, and gently remove.
2. Add 10 drops (~300 μ L) buffer into upright extraction tube using the stand provided.
3. Roll the swab 6+ times within tube, squeeze against inside of tube, let stand for 1 minute, and squeeze several more times.
4. Safely remove and discard the swab, and insert dropper tip into the tube containing the specimen.
5. Lay cassette flat and add four drops (~100 μ L) of the test sample into the sample well. Read results at 15 minutes.

Used materials should be discarded as biohazardous waste in accordance with local regulations.

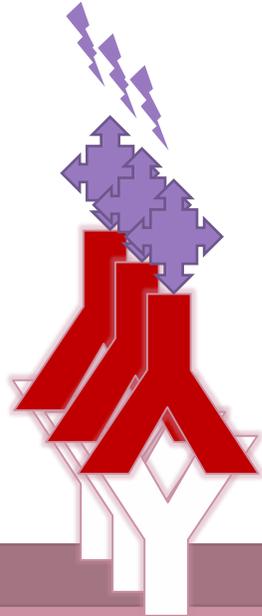
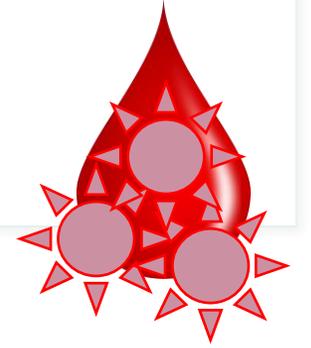
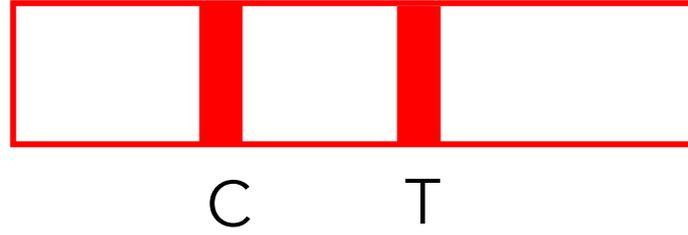


Adapted from: Ian M. Campell, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagnostic_Medical_Dipstick.png

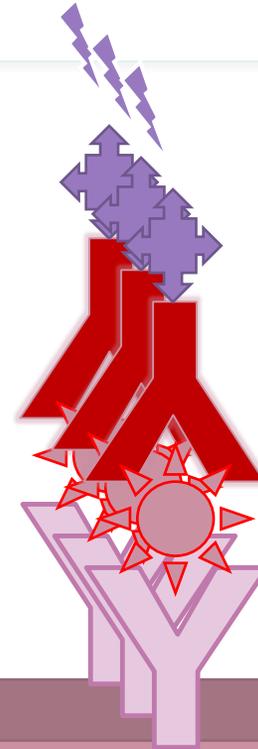


TEST POSITIVO

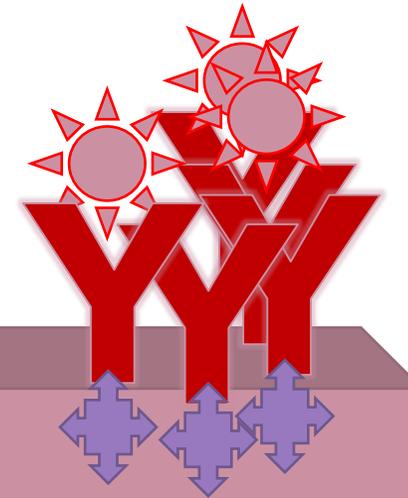
SANGUE POSITIVO

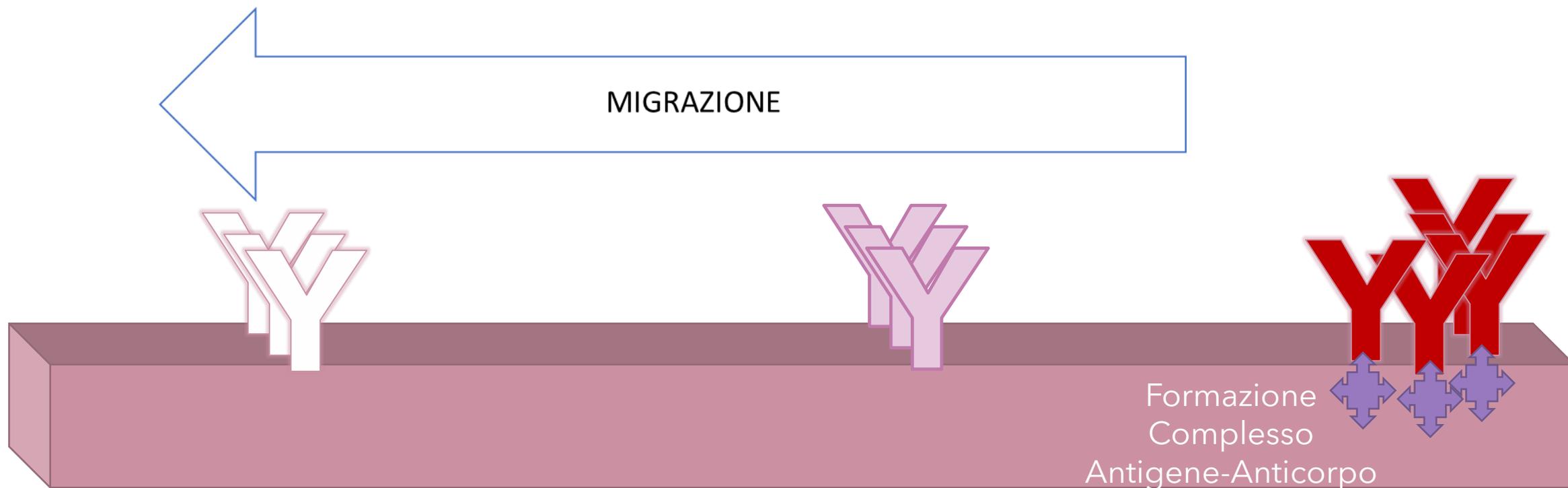


Formazione Complesso
Anticorpo-Anticorpo



Formazione Complesso
Anticorpo-Antigene-Anticorpo





2. TAMPONE RAPIDO (ANTIGENICO)

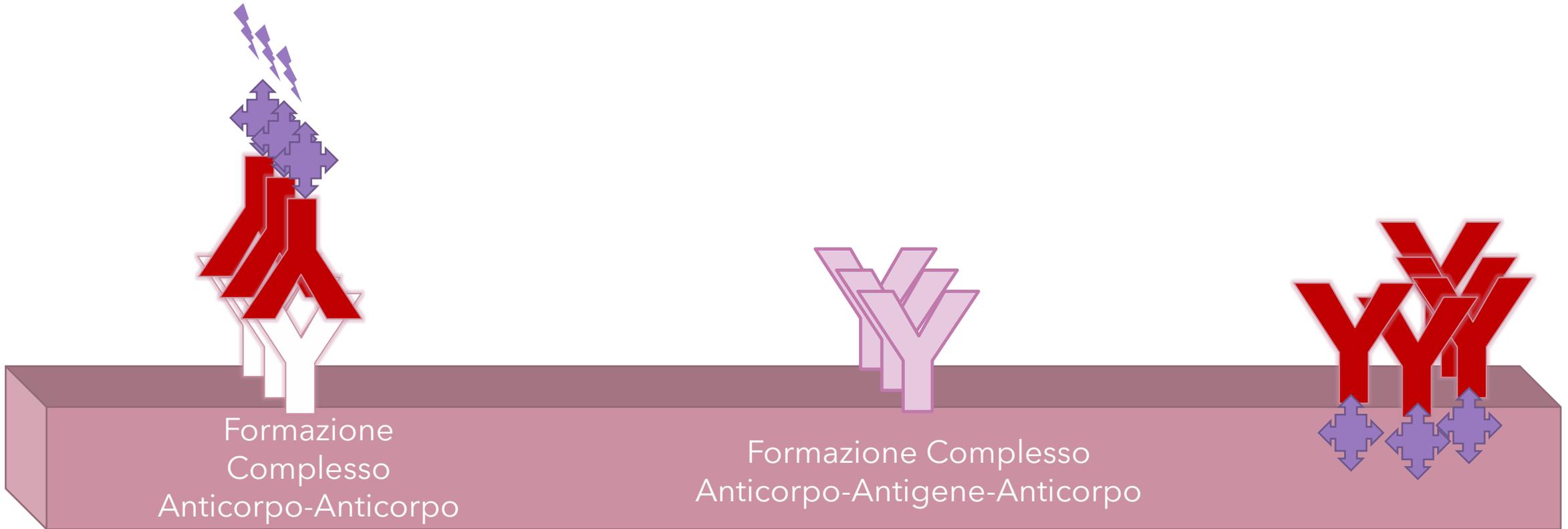
TEST NEGATIVO



C

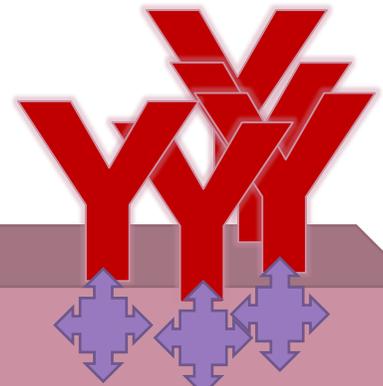
T

SANGUE SANO



Formazione
Complesso
Anticorpo-Anticorpo

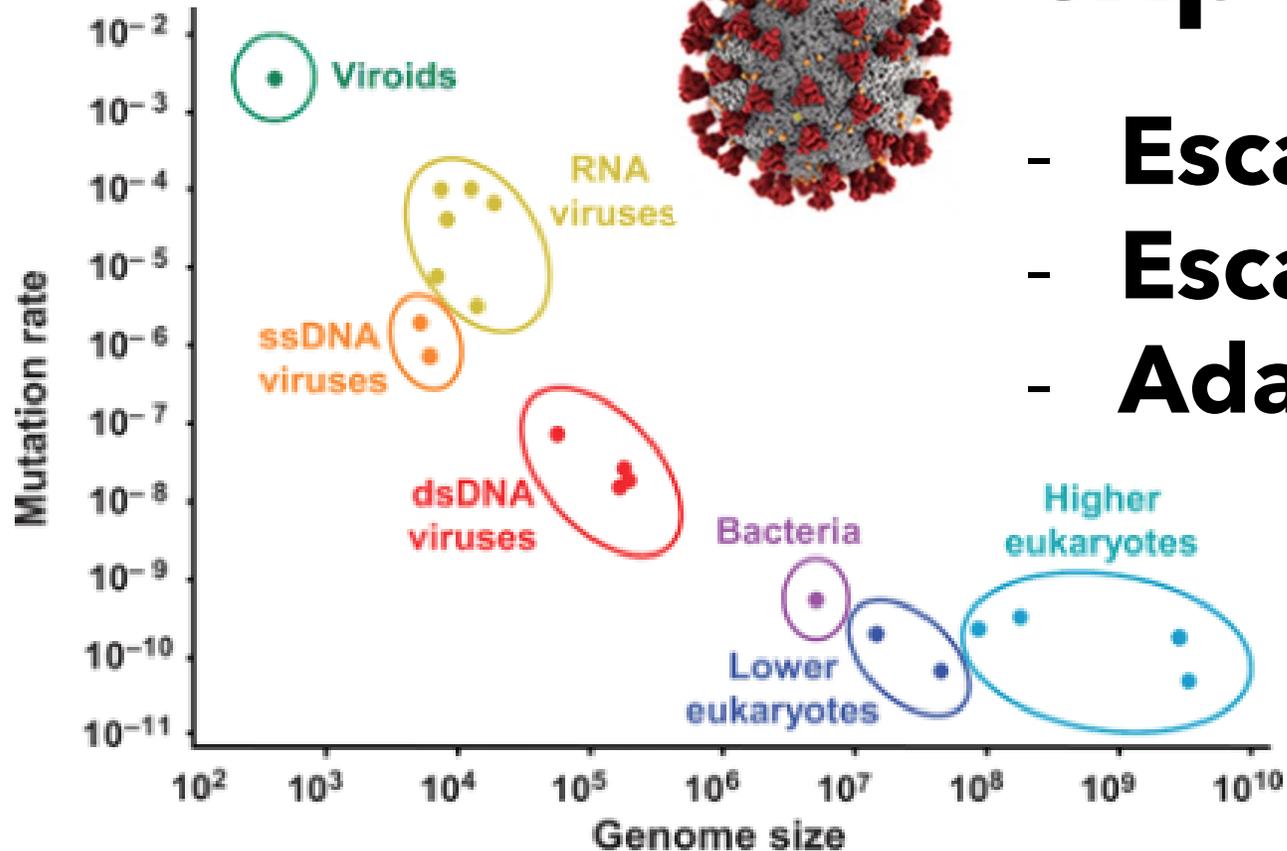
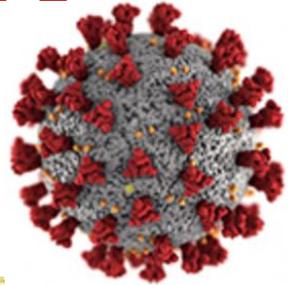
Formazione Complesso
Anticorpo-Antigene-Anticorpo



2. TAMPONE RAPIDO (ANTIGENICO)

New variants are expected:

SARS-CoV-2



- **Escape effect of antivirals**
- **Escape immune system**
- **Adapt to their environments**



WHO Variant classifications

Variant of Interest: Una variante con marcatori genetici specifici che sono stati associati a modifiche di legame del recettore, ridotta neutralizzazione da parte di anticorpi generati contro precedenti infezioni o vaccinazioni, ridotta efficacia dei trattamenti, potenziale impatto diagnostico o aumento previsto della trasmissibilità o della gravità della malattia.

Variant of Concern: una variante per la quale vi sono prove di un aumento della trasmissibilità, malattia più grave (aumento dei ricoveri o decessi), significativa riduzione della neutralizzazione da parte degli anticorpi generati durante precedenti infezioni o vaccinazioni, ridotta efficacia di trattamenti o vaccini o rilevamento diagnostico fallimenti.

Variant of High Consequence: Una variante che ha prove evidenti che le misure di prevenzione o le contromisure mediche (MCM) hanno un'efficacia significativamente ridotta rispetto alle varianti precedentemente circolanti..

How to detect SARS-CoV-2 Variants?

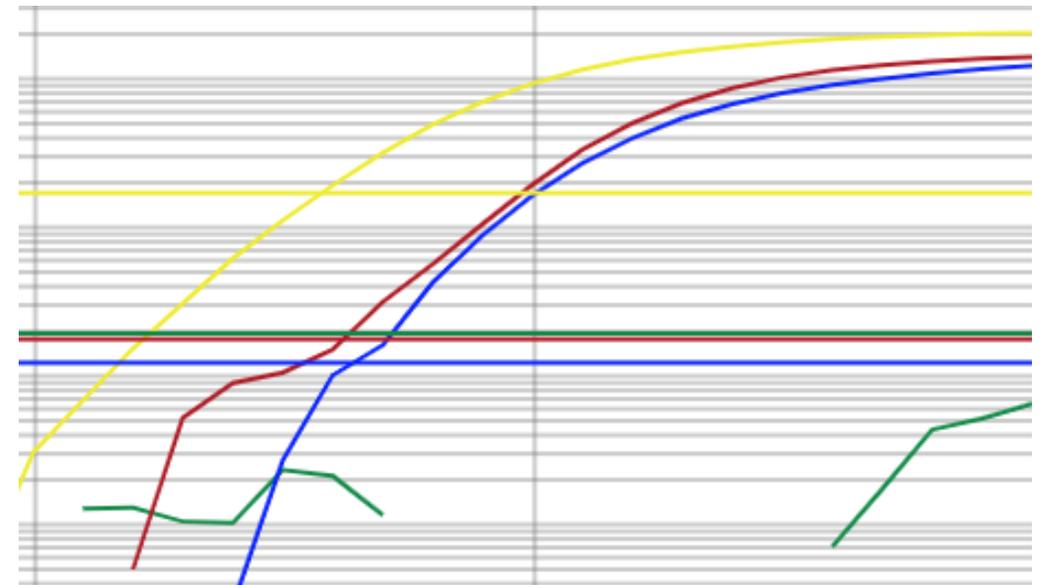
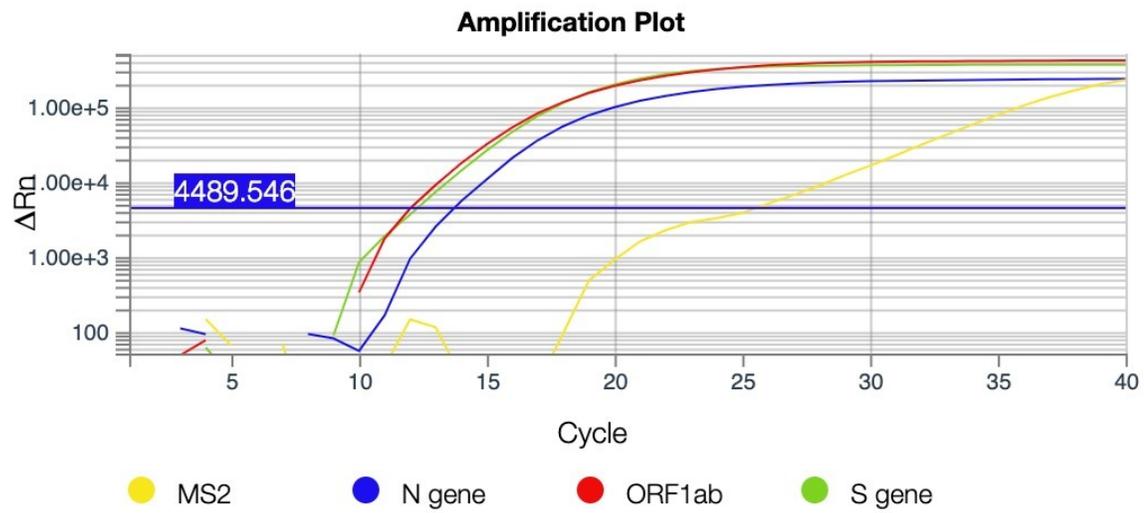
- 1st Step: SARS-CoV-2 RT-PCR test *TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit*

REALQUALITY RQ-SARS-CoV-2

- 2nd Step: **SARS-CoV-2 RT-PCR variants specific test** **COVID-19 Variant Catcher kit**
Allplex™ SARS-CoV-2 Variants I Assay

- 3rd Step: Sequencing the S gene by **Sanger** method or full genome sequencing by **NGS**

Variante S



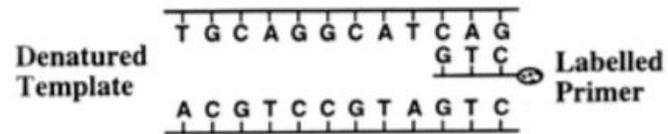
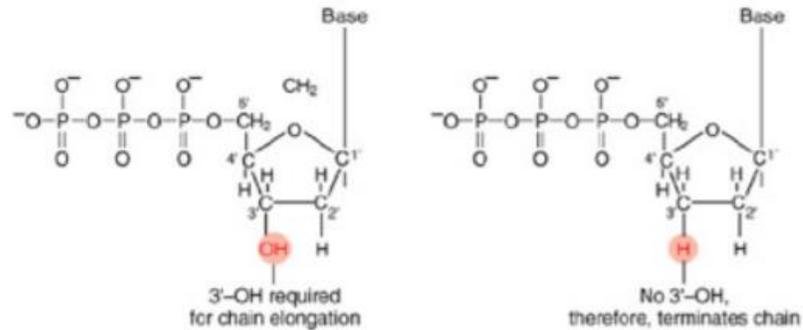
SEQUENZIAMENTO

The chain-termination method (Sanger): sviluppato da Fred Sanger nel 1977 consente sequenze/letture fino a 1000bp

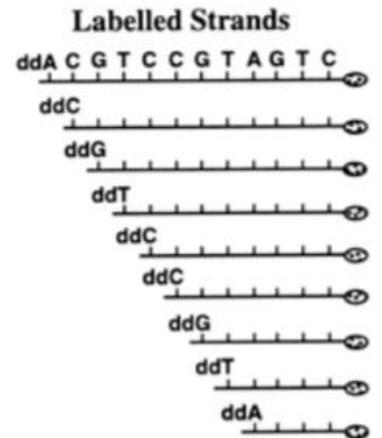
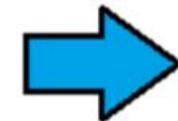
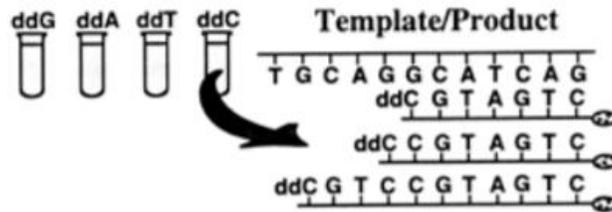
Next-generation sequencing (NGS): una serie di metodi che permettono di analizzare sequenze di DNA con strategie che permettono di ottenere milioni di sequenze in parallele (sequenziamento massivo parallelo).
Second-generation sequencing: Illumina, Roche 454, SOLiD and IonTorrent (LifeTechnologies), ... letture fino a 600bp □ Third-generation sequencing: MinION (OxfordNanopore), PacBio (Pacific Biosciences), ... letture >1000bp

Sequenziamento Sanger

- Didesossi-nucleotidi
- Templato viene amplificato con primer specifico in presenza di 4dNTPs + 1ddNTP = nucleotidi terminatori - uno diverso per ogni reazione
- Frammenti con terminazione random in base a quando ddNTP è incorporato



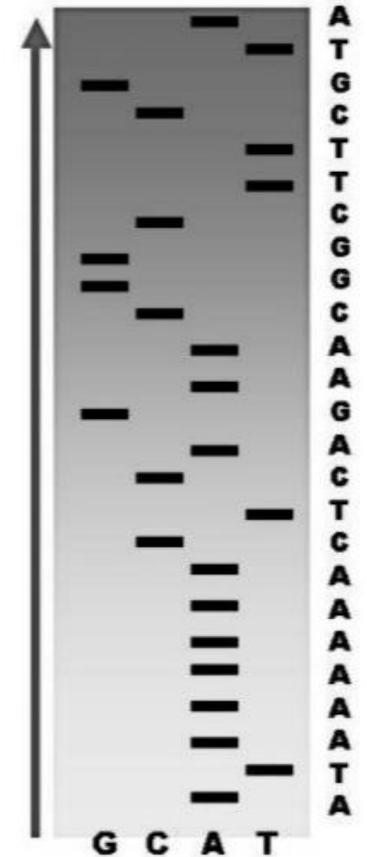
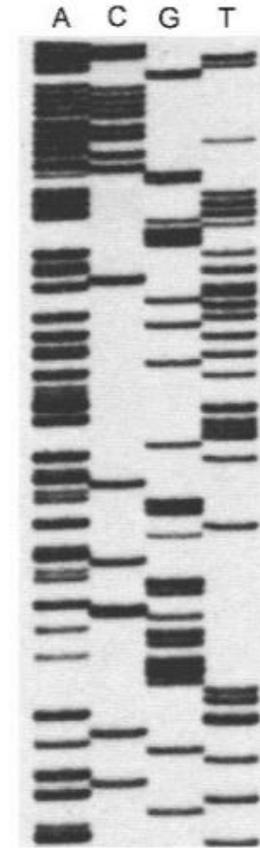
Add dNTPs and Polymerase



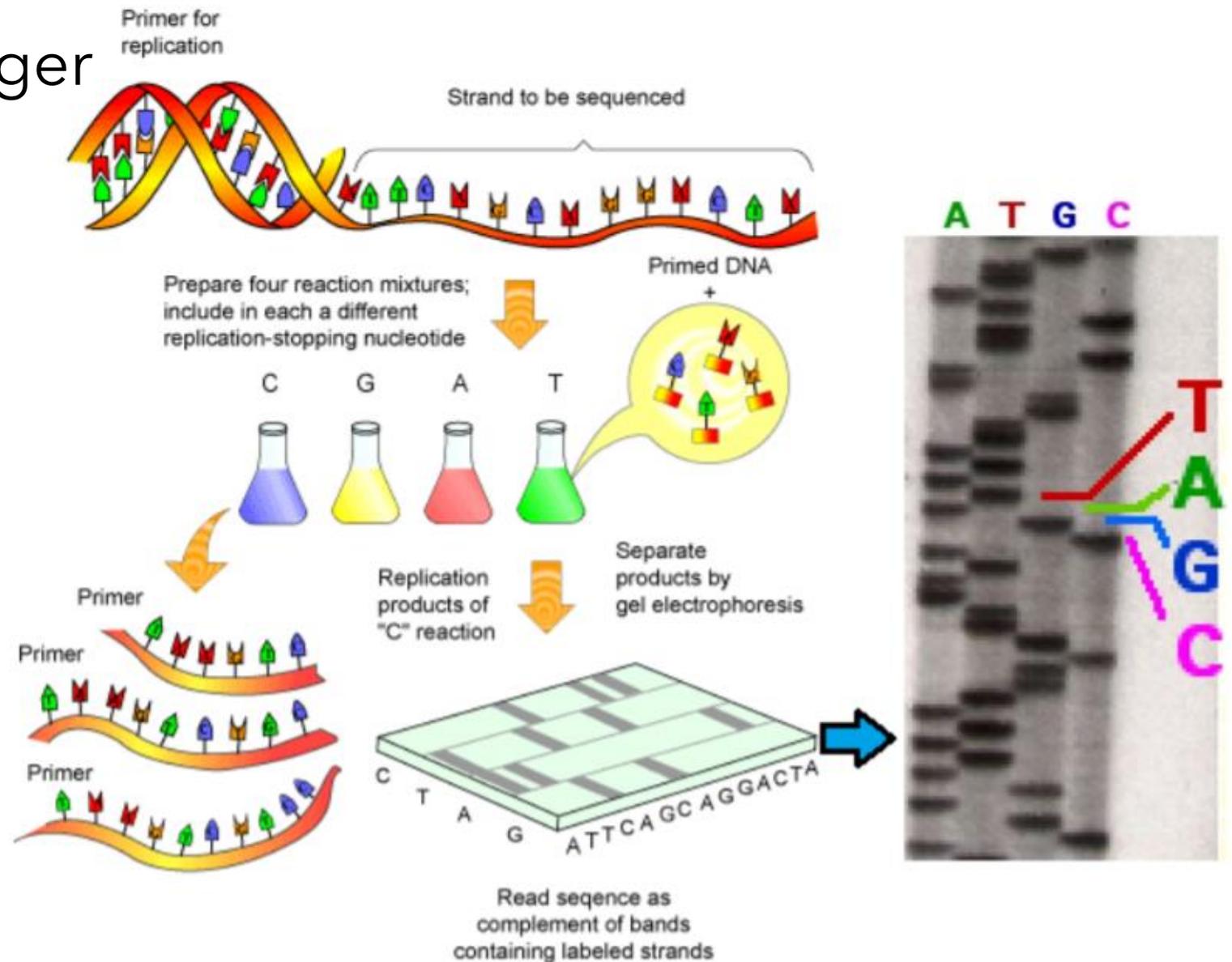
Sanger su Gel di poliacrilammide

I frammenti a termine della reazione vengono fatti correre con elettroforesi su gel di poliacrilammide

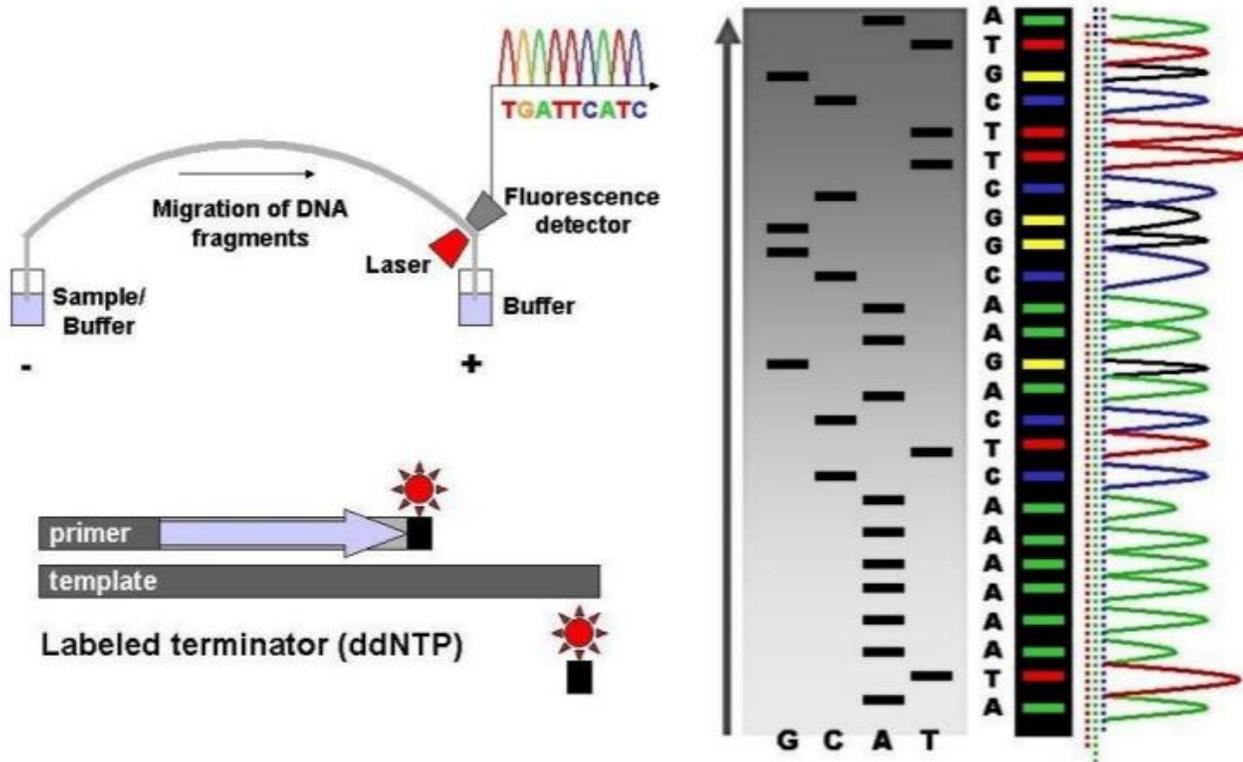
Per determinare la sequenza i prodotti delle 4 reazioni di chain termination (una per ddNTP) vengono caricati su lane differenti di un gel di poliacrilamide. La sequenza viene letta scorrendo il gel dal basso verso l'alto



Sequenziamento Sanger



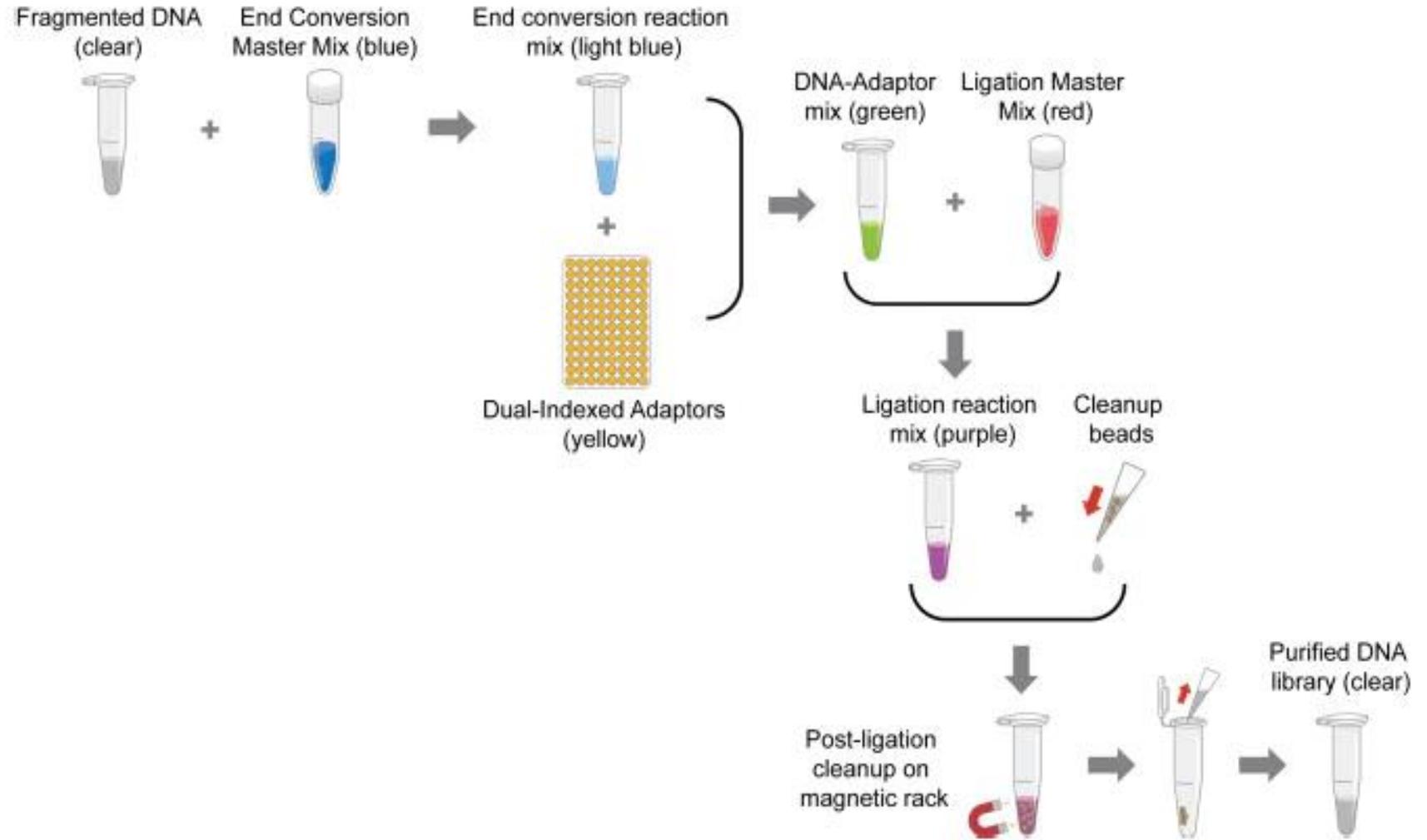
Sanger su capillare



4 differenti terminatori fluorescenti
elettroforesi capillare
rilevate direttamente da un
laser/detector e registrate come un
elettroferogramma

Next Generation Sequencing

Illumina: basato su Sequencing by Synthesis con didesossinucleotidi fluorescenti e adattori a doppia indicazione



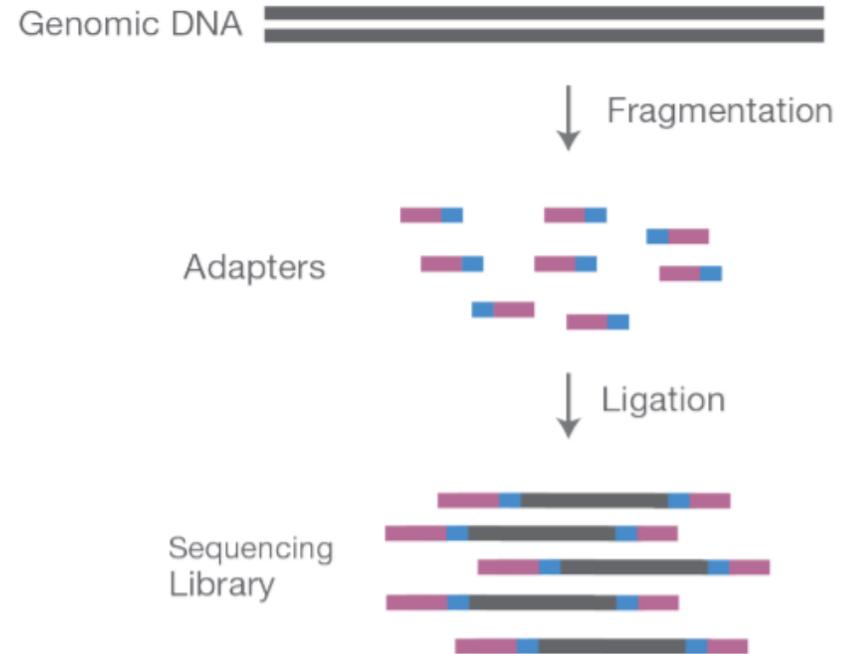
NGS

- Il DNA da sequenziare viene frammentato in maniera casuale in segmenti di 100-500 pb
- I frammenti di DNA devono essere denaturati
- I primers fiancheggianti il frammento da sequenziare
- Adattatori per legame del DNA al supporto (flowcell)
- DNA polimerasi ad alta processività
- dNTP, deossiribonucleotidi trifosfati;
- ddNTP dideossiribonucleotide trifosfato.

FORMAZIONE LIBRERIA DNA

Frammentazione del DNA
e legame ad adattatori

A. Library Preparation

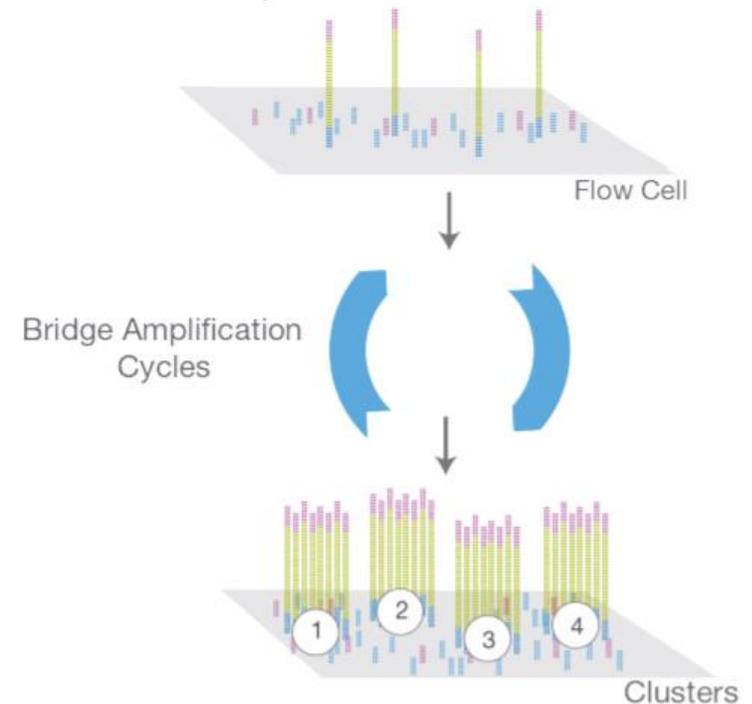


NGS library is prepared by fragmenting a gDNA sample and ligating specialized adapters to both fragment ends.

AMPLIFICAZIONE IN CLUSTER

La libreria viene fatta aderire al flowcell e ciascun frammento viene amplificato in cluster, la formazione di amplificati a ponte

B. Cluster Amplification

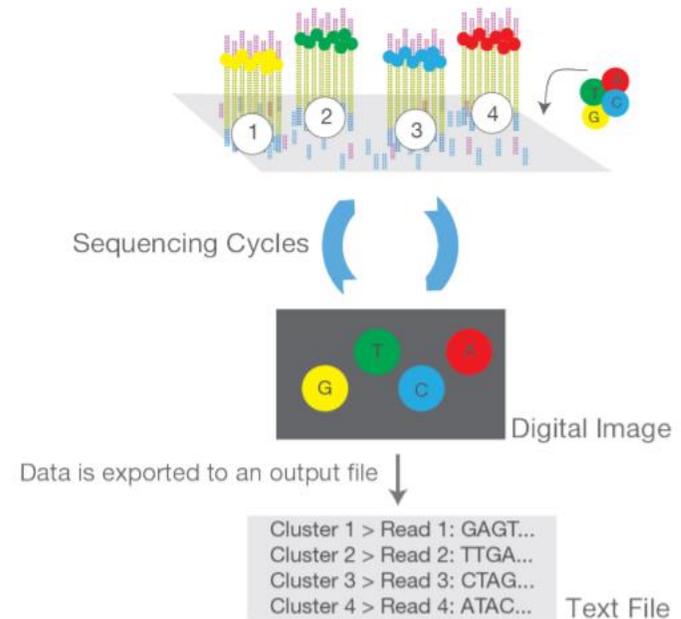


Library is loaded into a flow cell and the fragments are hybridized to the flow cell surface. Each bound fragment is amplified into a clonal cluster through bridge amplification.

sequencing

Per sequenziamento vengono impiegati ddNTP fluorescenti, la polimerasi ed un primer complementare all'adattatore

C. Sequencing



Sequencing reagents, including fluorescently labeled nucleotides, are added and the first base is incorporated. The flow cell is imaged and the emission from each cluster is recorded. The emission wavelength and intensity are used to identify the base. This cycle is repeated "n" times to create a read length of "n" bases.

allineamenti

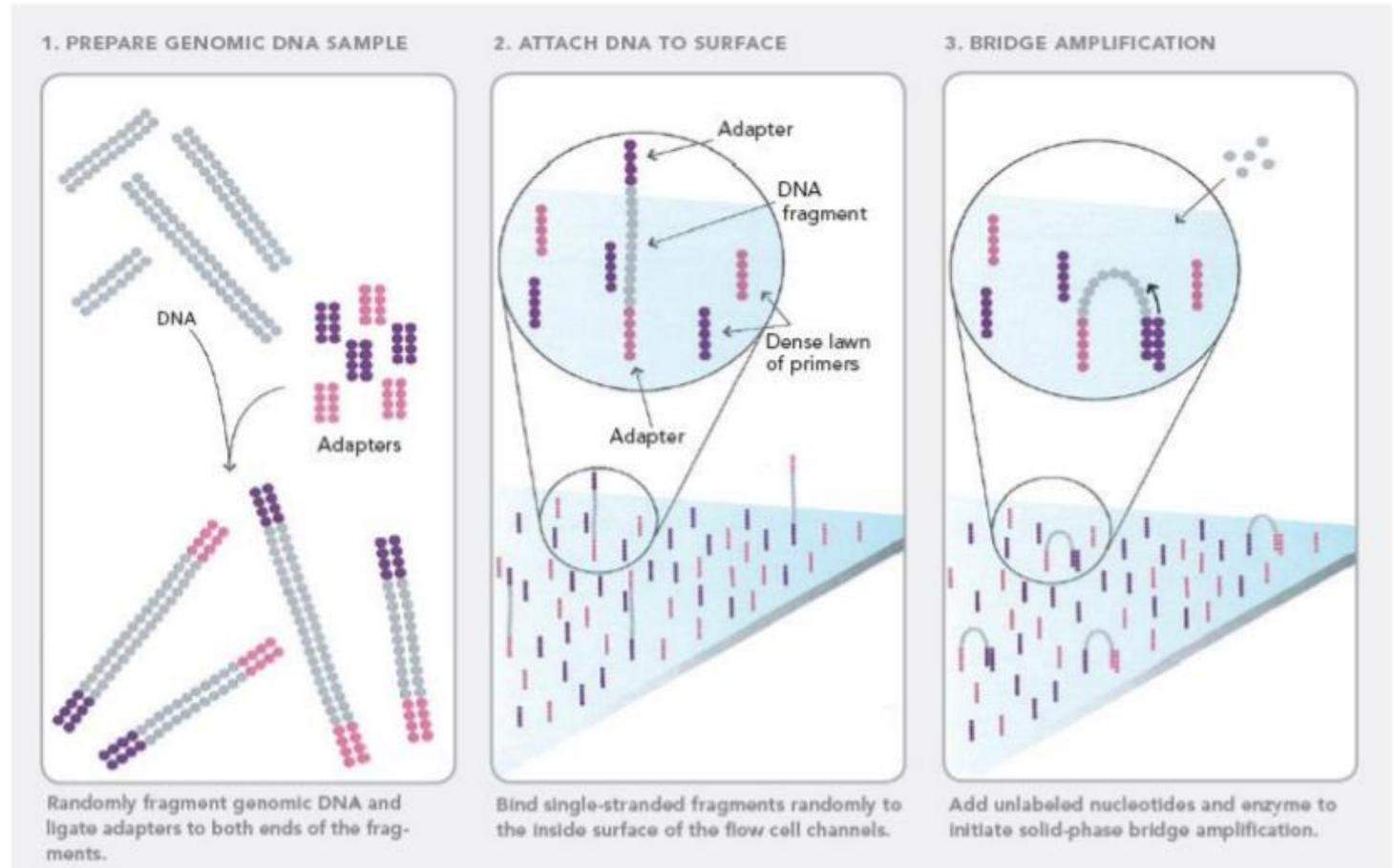
D. Alignment and Data Analysis

Reads	ATGGCATTGCAATTTGACAT
	TGGCATTGCAATTTG
	AGATGGTATTG
	GATGGCATTGCAA
	GCATTGCAATTTGAC
	ATGGCATTGCAATT
	AGATGGCATTGCAATTTG
Reference Genome	AGATGGTATTGCAATTTGACAT

Reads are aligned to a reference sequence with bioinformatics software. After alignment, differences between the reference genome and the newly sequenced reads can be identified.

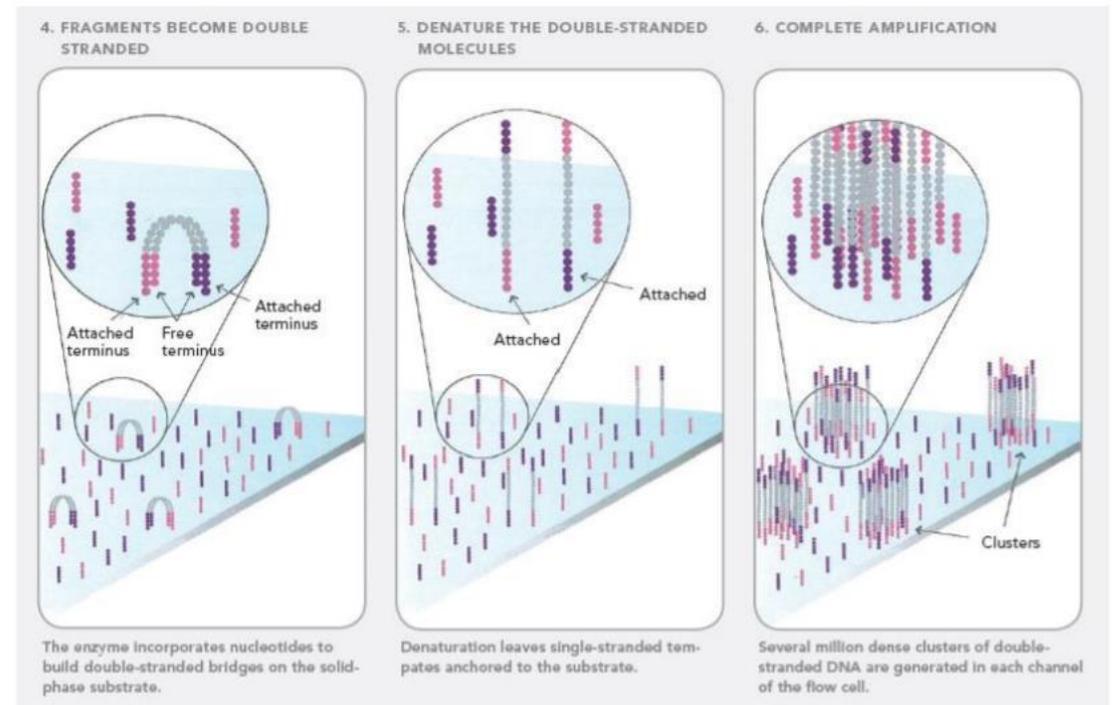
ADATTATORI

Gli adattatori si legano alle estremità dei frammenti che bloccano sul supporto e contengono una regione di appaiamento per i primers di sequenziamento



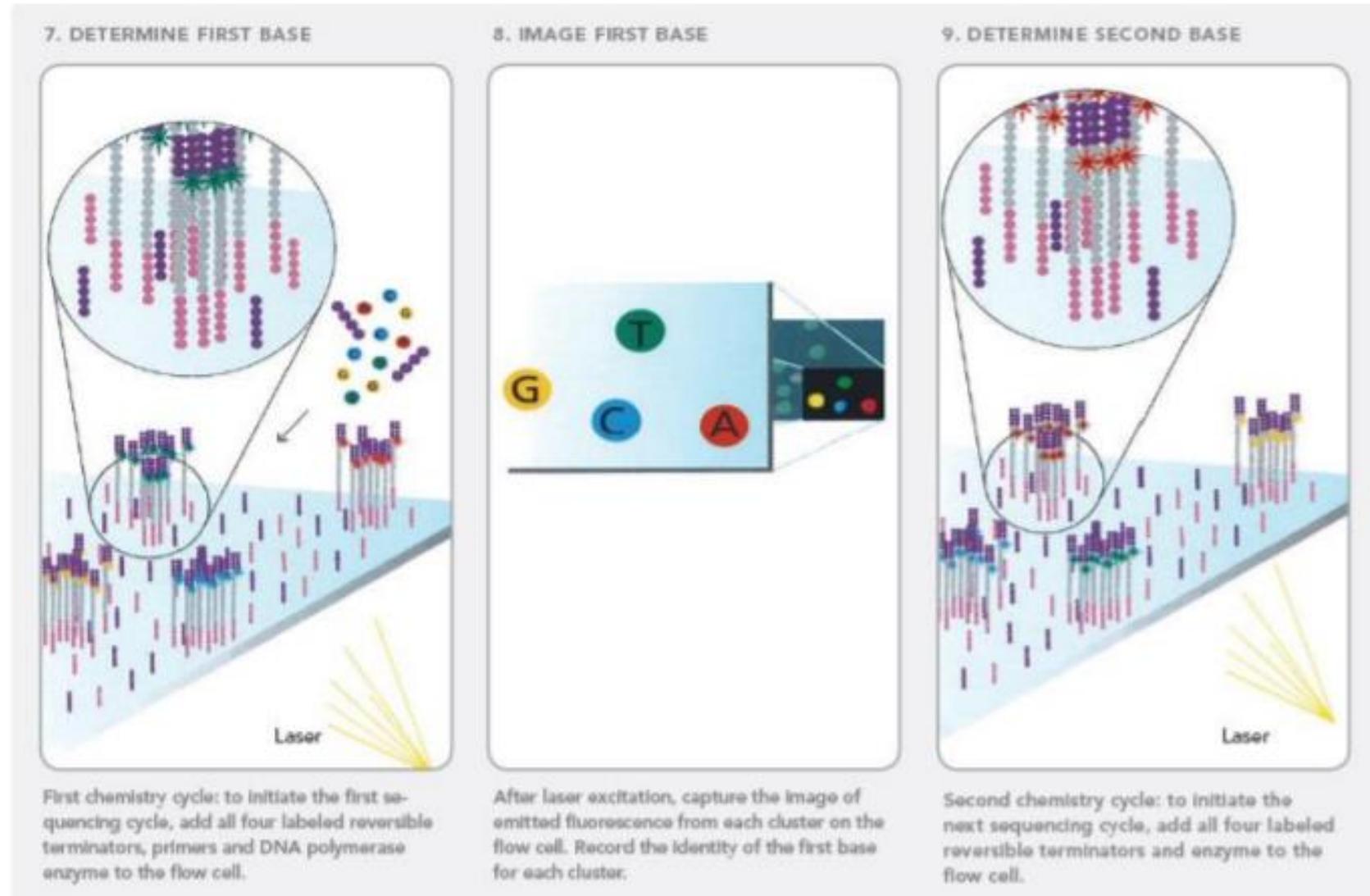
BRIDGE AMPLIFICATION

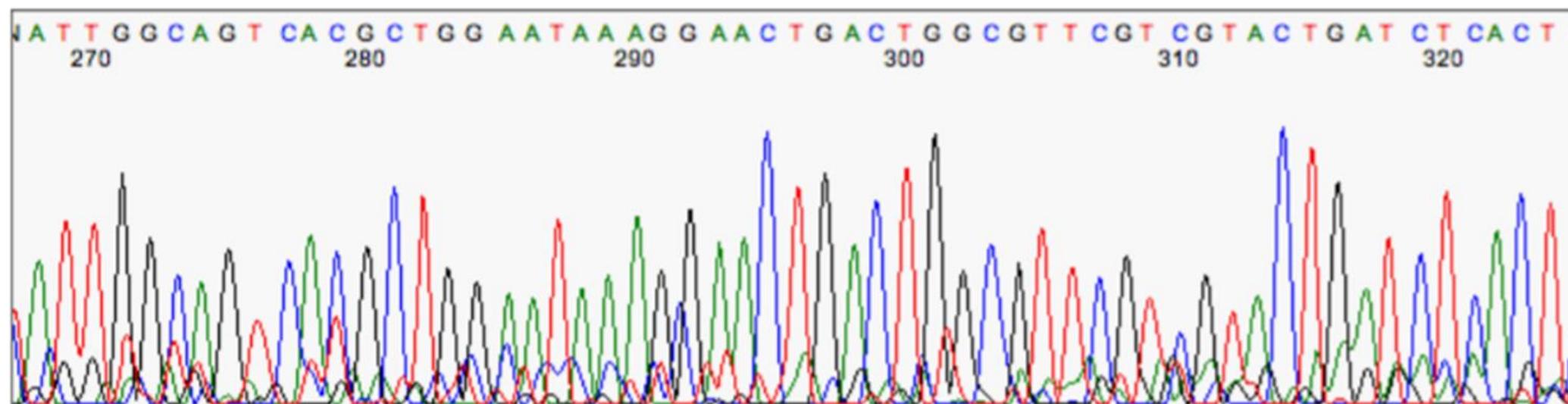
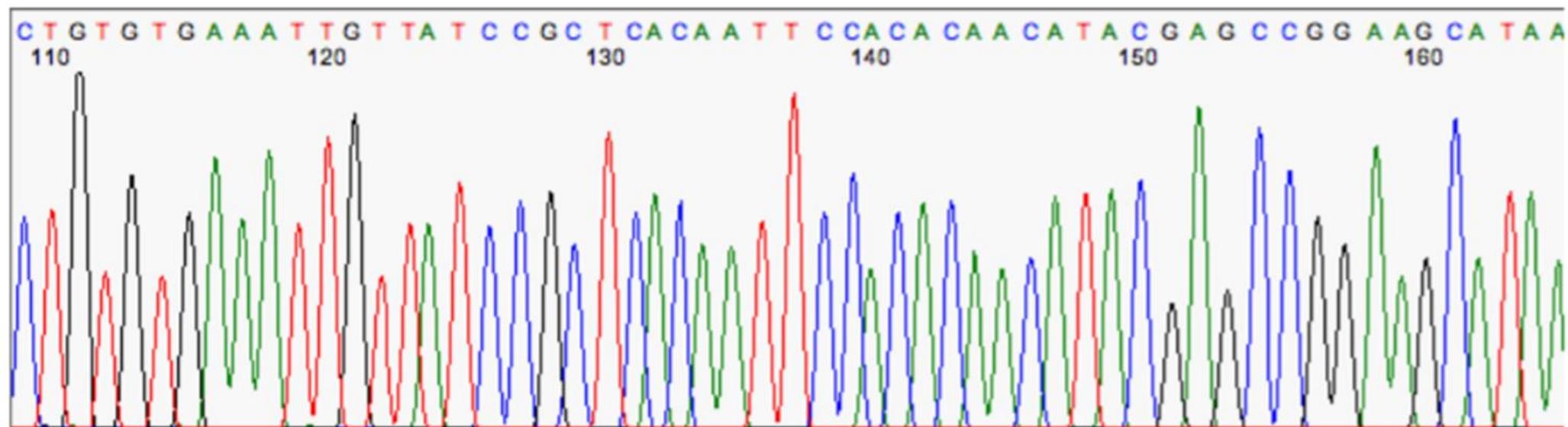
Dopo aggiunta di DNA polimerasi e dNTPs avviene amplificazione nota come "**bridge amplification**". I frammenti, poi, si ibridano con gli oligonucleotidi presenti sul supporto e legheranno i **primers adiacenti** formando la tipica struttura a ponte. In seguito la polimerasi sintetizza il filamento opposto e tale **processo** viene ripetuto più volte. Alla fine per **preparare** i filamenti al sequenziamento si esegue la linearizzazione, dopo di ciò sarà possibile osservare la formazione di diversi **clusters**.



sequencing by synthesis

ddNTPs differenti ognuno dei quali legato con un fluorocromo diverso. Quando uno di questi **ddNTP** viene incorporato nel filamento, l'emissione di fluorescenza viene rilevata da uno specifico detector dopodiché il software registra le diverse emissioni di fluorescenza e le converte nella sequenza nucleotidica corrispettiva





THANKS TO:

IVANA ANTONUCCI
SANDRA BIBBO'
CARLOTTA BUCCOLINI
MATTEO CAPANNA
EMILY CAPONE
VERENA DAMIANI
SIMONE DE FABRITIIS
CAROLA DI CAMILLO
FABRIZIO DI GIUSEPPE
FEDERICADI MARCO
PAMELA DI TOMO
BEATRICE DUFRUSINE
ROSSELLA FERRANTE
ROBERTO FERRANTE

DOMITILLA MANDATORI
LUCA NATALE
LETIZIA PELUSI
ANTONELLA POTENZA
FRANCESCA POTENZA
MARIANNA RANAUDO
ANNA GIULIA RUGGIERI
SIMONE STEFANETTI
ANGELO VERONESE
LIBORIO STUPPIA
VINCENZO DE LAURENZI



Università degli Studi "G. d'Annunzio"
Centro di Studi e Tecnologie Avanzate - "CAST"

